

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANEAMENTO,**  
**MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS**

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA PCR PARA**  
**DETECÇÃO DE BACTÉRIAS**  
**POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS EM UM**  
**SISTEMA UASB-LAGOAS DE POLIMENTO**  
**PARA TRATAMENTO DE ESGOTO DOMÉSTICO**

**Fernanda Maria Santos do Nascimento**

**Belo Horizonte**

**2008**

**Aplicação da Técnica PCR para Detecção de Bactérias  
Potencialmente Patogênicas em um Sistema UASB-Lagoas  
de Polimento para Tratamento de Esgoto Doméstico**

**Fernanda Maria Santos do Nascimento**

**Fernanda Maria Santos do Nascimento**

**Aplicação da Técnica PCR para Detecção de Bactérias  
Potencialmente Patogênicas em um Sistema UASB-Lagoas  
de Polimento para Tratamento de Esgoto Doméstico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Saneamento

Linha de pesquisa: Tratamento de Águas Residuárias

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Silvana de Queiroz Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos von Sperling

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

2008

Página com as assinaturas dos membros da banca examinadora, fornecida pelo Colegiado do Programa.

# DEDICATÓRIA

Aos amores da minha vida: meus pais Elmo e Fátima,  
minhas irmãs Patrícia e Carla e meu namorado  
Giovani.

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora do Carmo que sempre mantiveram-se ao meu lado.

À minha querida orientadora, Dra. Silvana de Queiroz Silva, meus maiores e sinceros agradecimentos. Seu exemplo de profissionalismo e de comprometimento me fez e me faz acreditar que vale a pena trabalhar em prol da ciência. Obrigada pela paciência, cordialidade, amizade e pelos ensinamentos. A você, Sil, minha eterna gratidão.

À amiga Valéria, pela oportunidade da pesquisa, pelos treinamentos no laboratório e por dividir comigo seus conhecimentos. Sua ajuda foi primordial para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Marcos von Sperling, pela confiança, oportunidade, ensinamentos e pelo excelente exemplo de profissionalismo.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório, em especial, Eriquinha, Grazi, Aninha, Ana Maria, Jú e Val. Obrigada pela amizade, ajuda e pelo excelente convívio no laboratório de Microbiologia do DESA/UFMG.

À Dra. Juliana Calábria por todo auxílio dispensado a mim e pelo livro emprestado. Muito obrigada!

Às minhas amigas, Carol Moreira e Susy por toda a força, incentivo, ajuda e consideração, desde a seleção do mestrado até os dias de hoje. A vocês, amigas de longa data, o mais profundo e sincero agradecimento.

Aos meus queridos e amados pais por acreditarem em mim e me apoiarem continuamente. Vocês são a luz que ilumina a minha vida.

Às minhas duas irmãs e amigas, Paty e Carlinha, pela confiança, companheirismo e por deixarem os meus dias muito mais alegres.

Ao meu namorado Giovani Aihara pela imprescindível ajuda durante toda a etapa de realização deste trabalho, principalmente na etapa final. Obrigada pela força, pela confiança e por fazer parte da minha vida!

À Capes e ao CNPq pela bolsa concedida e ao PROSAB pelo financiamento à pesquisa.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram ou torceram para a realização deste trabalho.

*De tudo ficaram três coisas:  
A certeza de que estamos sempre começando...  
A certeza de que precisamos continuar...  
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.  
Portanto, devemos:  
Fazer da interrupção um caminho novo...  
Da queda, um passo de dança...  
Do medo, uma escada...  
Do sonho, uma ponte...  
Da procura, um encontro.*

**Adaptado de Fernando Sabino**

## RESUMO

O sistema composto por uma reator UASB seguido de lagoas de polimento em série (UASB-LP) tem sido aplicado com sucesso para o tratamento de esgoto doméstico, com eficiente remoção de matéria orgânica e inorgânica, bem como de microrganismos patogênicos. A avaliação da remoção de bactérias patogênicas em sistemas de tratamento ocorre geralmente pelo decaimento de bactérias coliformes fecais e da bactéria *Escherichia coli*. Atualmente têm-se utilizado a técnica molecular da reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction* - PCR) para detecção de bactérias patogênicas em amostras de água, alimentos e em análises clínicas. O presente trabalho teve por objetivo estabelecer metodologia de preparação e concentração das diferentes amostras que compõem o sistema UASB-LP para aplicação da técnica PCR para detecção de bactérias patogênicas em amostras de esgoto bruto e efluentes tratados. Com este trabalho foram estabelecidas as condições para o monitoramento das espécies *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Salmonella typhimurium*, *Shigella* spp., *Shigella dysenteriae*, *Helicobacter pylori*, *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus aureus* utilizando *primers* específicos. Os resultados obtidos com o monitoramento das bactérias permitiram concluir que as bactérias *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. e *Shigella dysenteriae* detectadas no esgoto bruto foram removidas ao longo das unidades de tratamento, não sendo detectadas no efluente final. Já a bactéria *Salmonella typhimurium* foi detectada nos efluentes das lagoas e no efluente final. *Helicobacter pylori* e *Staphylococcus aureus* não foram detectadas no esgoto bruto e nos efluentes das unidades de tratamento. Estes resultados mostram a aplicabilidade da técnica PCR para investigação qualitativa de bactérias patogênicas em sistemas de tratamento de esgotos.

## ABSTRACT

Wastewater treatment based on a UASB reactor followed by polishing ponds is well established for removing organic and inorganic matter, as well as pathogenic microorganisms. Usually the evaluation of pathogenic bacteria removal in wastewater treatment systems is carried out by analyzing fecal coliforms and *Escherichia coli* decay. Recently molecular techniques based on polymerase chain reaction method (PCR) have been applied for detecting pathogenic bacteria in water, food and clinical samples. The present work aimed to establish a methodology for sample preparation, DNA extraction and PCR analysis in samples along the UASB- polishing ponds system for several pathogenic bacteria. Monitoring of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Salmonella typhimurium*, *Shigella* spp., *Shigella dysenteriae*, *Helicobacter pylori*, *Enterococcus* spp., e *Staphylococcus aureus* were performed by PCR using specific primers. It can be concluded from results obtained in this research that *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp and *Shigella dysenteriae* were detected in the raw sewage and were removed along the UASB- polishing ponds system since they were not detected in the final effluent. On the other hand, DNA from *Salmonella typhimurium* was detected only in the effluent from polishing ponds and in the final effluent. *Helicobacter pylori* e *Staphylococcus aureus* were not detected in any analyzed samples. The results obtained here show the applicability of PCR method for monitoring pathogenic bacteria in wastewater systems

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>4</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>5</b>
3.1 UASB E LAGOAS DE POLIMENTO NO TRATAMENTO BIOLÓGICO DE ESGOTOS DOMÉSTICOS .....	5
3.1.1 <i>Atividade biológica em reatores UASB e lagoas de polimento</i> .....	9
3.2 REMOÇÃO DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS EM SISTEMA UASB E LAGOAS DE POLIMENTO.....	12
3.3 ORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL .....	14
3.4 PRINCIPAIS DOENÇAS DE VEICULAÇÃO HÍDRICA E BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ASSOCIADAS.....	16
3.4.1 <i>Escherichia coli</i> .....	17
3.4.2 <i>Shigella spp.</i> .....	18
3.4.3 <i>Salmonella spp.</i> .....	19
3.4.4 <i>Enterococcus spp.</i> .....	20
3.4.5 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
3.4.6 <i>Campylobacter jejuni</i> .....	21
3.4.7 <i>Clostridium perfringens</i> .....	21
3.4.8 <i>Vibrio cholerae</i> .....	22
3.4.9 <i>Helicobacter pylori</i> .....	22
3.4.10 <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	23
3.5 BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DETECTADAS EM ESGOTOS DOMÉSTICOS .....	23
3.6 TÉCNICAS APLICADAS PARA INVESTIGAÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS .....	26
3.6.1 <i>Técnicas tradicionais</i> .....	26
3.6.2 <i>Técnicas moleculares</i> .....	27
3.6.3 <i>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</i> .....	28
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 ÁREA DE ESTUDO E CARACTERÍSTICAS DO SISTEMA UASB-LP .....	32
4.2 AMOSTRAGEM .....	33
4.3 MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS .....	34
4.4 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO .....	35
4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) .....	38
4.6 CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS BACTERIANAS .....	42
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
5.1 AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE PREPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	43
5.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	45
5.2.1 <i>Avaliação dos protocolos de extração de DNA</i> .....	45
5.2.2 <i>Extração de DNA das amostras do sistema UASB-LP e das culturas puras</i> .....	46
5.3 AMPLIFICAÇÕES POR PCR.....	47
5.3.1 <i>Determinação das temperaturas de anelamento para culturas puras</i> .....	47
5.3.2 <i>Detecção das bactérias patogênicas por PCR</i> .....	50
5.4 COMPARAÇÃO DO MONITORAMENTO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ENTRE COLETAS .....	61
5.5 COMPARAÇÃO DO MONITORAMENTO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ENTRE UNIDADES DE TRATAMENTO	
63	
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>7 RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>67</b>

<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>68</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>75</b>
9.1	ANEXO 1 .....	75
9.2	ANEXO 2 .....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ATCC:** American Type Culture Collection ou Coleção de cultura americana
- BSA:** *Bovine serum albumin* ou albumina de soro bovino
- CePTS:** Centro de Pesquisas e Treinamento em Saneamento
- COPASA:** Companhia de Saneamento de Minas Gerais
- DBO:** Demanda Bioquímica de Oxigênio
- DESA:** Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental.
- DNA:** *Desoxiribonucleic acid* ou ácido desoxirribonucleico
- DNAr:** região do DNA que codifica o RNAr 16S
- DQO:** Demanda Química de Oxigênio
- ETE:** Estação de Tratamento de Esgotos
- FUNED:** Fundação Esequiel Dias
- LP:** Lagoa de Polimento
- NMP:** Número mais provável
- OD:** Oxigênio Dissolvido
- OMS:** Organização Mundial de Saúde
- Org/mL:** Organismo por mL
- PCR:** *Polimerase chain reaction* ou reação em cadeia da polimerase
- pH:** Potencial Hidrogeniônico
- PROSAB:** Programa de Pesquisa em Saneamento Básico
- RNA:** *Ribonucleic acid* ou ácido ribonucleico
- RNAr:** RNA ribossomal
- rpm:** Rotações por minuto
- SST:** Sólidos Suspensos Totais
- SSV:** Sólidos Suspensos Voláteis
- SUS:** Sistema Único de Saúde
- TAH:** Taxa de aplicação hidráulica
- Taq:** *Thermoaquaticus*
- TDH:** Tempo de detenção hidráulica
- UASB:** *Upflow anaerobic sludge blanket* ou reator anaeróbio de manta de lodo de fluxo ascendente
- UFC:** Unidade formadora de colônia
- WHO:** World Health Organization

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b> - Representação esquemática de um reator UASB cilíndrico, de pequeno porte (250 habitantes). Fonte: von Sperling, 2005.....	6
<b>Figura 3.2</b> - Etapas metabólicas e microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia da matéria orgânica à metano. Fonte: Abreu, 2007.....	10
<b>Figura 3.3</b> - Processos biológicos da remoção da matéria orgânica em lagoas facultativas. ..	11
<b>Figura 3.4</b> - Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	29
<b>Figura 4.1</b> - Vista do sistema reator UASB – Lagoas de polimento (1, 2, 3) e filtro de pedra. ....	32
<b>Figura 4.2</b> - Esquema Geral do Sistema UASB-Lagoas de polimento e Filtro, com os respectivos pontos de coleta das amostras (EB, UASB, L1, L2, L3 e F).....	33
<b>Figura 4.3</b> - Fluxograma da estratégia de PCR.....	41
<b>Figura 4.4</b> – Padrão do <i>ladder GeneRuler</i> 1Kb.....	42
<b>Figura 4.5</b> – Padrão do <i>ladder O'GeneRuler</i> 100 bp.....	42
<b>Figura 5.1</b> - Gel confirmativo de extração do DNA das amostras obtidas dos procedimentos 1 e 2.....	44
<b>Figura 5.2</b> - Gel confirmativo de extração do DNA das amostras obtidas dos procedimentos 3 e 4.....	44
<b>Figura 5.3</b> - Imagem negativa do gel confirmativo de extração do DNA pelo método adaptado de Lemarchand <i>et al.</i> (2005) (método 1).....	46
<b>Figura 5.4</b> - Imagem negativa do gel confirmativo de extração do DNA pelo método de Egli <i>et al.</i> (2003) (método 2).....	46
<b>Figura 5.5</b> - Imagem negativa do gel confirmativo de extração do DNA para as amostras do esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro.....	47
<b>Figura 5.6</b> – Gel confirmativo da extração de DNA para as amostras do esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro.....	47
<b>Figura 5.7</b> - Gel confirmativo de extração do DNA para as amostras de cultura pura: a) <i>Escherichia coli</i> b) <i>Shigella sonnei</i> c) <i>Staphylococcus aureus</i> d) <i>Enterococcus faecallis</i> e) <i>Salmonella</i> spp. e f) <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	47
<b>Figura 5.8</b> - Resultados do PCR-gradiente para as culturas puras testadas: a) <i>Escherichia coli</i> , primers L-uid739 e R-uid578; b) <i>Enterococcus faecallis</i> , primers Ent1 e Ent2; c) <i>Helicobacter pylori</i> , primers HP1 e HP2 d) <i>Salmonella</i> spp., primers L-himA e R-himA; e) <i>Shigella sonnei</i> , primers Shi-1 e Shi-2; f) <i>Staphylococcus aureus</i> , primers nuc1 e nuc2. Controles negativos: <i>Salmonella</i> (a, b), <i>E. coli</i> (c, d, f), <i>Yersinia enterocolitica</i> (e).....	48
<b>Figura 5.9</b> - Resultados do PCR-gradiente para as culturas puras testadas: a) <i>Shigella sonnei</i> , primers L-phoBR e R-phoBR; b) <i>Salmonella</i> spp., primers Sal-3 e Sal-4; c) <i>Yersinia enterocolitica</i> , primers Y.16S-86f e Y.e.eur.16S-455r. Controles negativos: <i>Yersinia enterocolitica</i> (a), <i>Enterococcus faecallis</i> (b), <i>Shigella sonnei</i> (c).....	49
<b>Figura 5.10</b> – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os primers para <i>Escherichia coli</i> .....	51
<b>Figura 5.11</b> – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os primers para <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica.....	53
<b>Figura 5.12</b> – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os primers para <i>Salmonella</i> spp.....	54
<b>Figura 5.13</b> – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os primers para <i>Salmonella typhimurium</i> .....	56

<b>Figura 5.14</b> – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os <i>primers</i> para <i>Shigella</i> spp. ....	57
<b>Figura 5.15</b> – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os <i>primers</i> para <i>Shigella dysenteriae</i> . ....	57
<b>Figura 5.16</b> – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os <i>primers</i> para <i>Enterococcus</i> spp. ....	58
<b>Figura 5.17</b> – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os <i>primers</i> para <i>Helicobacter pylori</i> . ....	59
<b>Figura 5.18</b> – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os <i>primers</i> 1541 e Ep.F10 para o domínio <i>Bacteria</i> . ....	59
<b>Figura 5.19</b> – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os <i>primers</i> para <i>Helicobacter pylori</i> . ....	60
<b>Figura 5.20</b> – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os <i>primers</i> para <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> – Vantagens e desvantagens das lagoas de polimento .....	8
<b>Tabela 3.2</b> - Principais doenças de veiculação hídrica associadas a bactérias, agente causador e dose infectante* .....	17
<b>Tabela 3.3</b> – Bactérias patogênicas detectadas e ou quantificadas em esgotos brutos .....	24
<b>Tabela 4.1</b> - Características do reator UASB e das lagoas de polimento.....	32
<b>Tabela 4.2</b> - Característica do Filtro de pedra (brita 3).....	33
<b>Tabela 4.3</b> - Descrição dos pontos de amostragem.....	34
<b>Tabela 4.4</b> - Procedimentos testados para preparação de amostra do efluente das lagoas de polimento .....	35
<b>Tabela 4.5</b> - Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de PCR.....	38
<b>Tabela 4.6</b> - Lista dos <i>primers</i> específicos utilizados para detecção de bactérias patogênicas por PCR .....	39
<b>Tabela 4.7</b> - Culturas puras de bactérias, gradiente de temperatura e fonte das culturas.....	40
<b>Tabela 5.1</b> - Resultados de PCR para as bactérias investigadas .....	62
<b>Tabela 9.1</b> - Parâmetros físico-químicos das amostras do dia 25/04/2007 .....	75
<b>Tabela 9.2</b> - Parâmetros físico-químicos das amostras do dia 27/02/2008 .....	75
<b>Tabela 9.3</b> - Equipamentos e reagentes necessários para realização de monitoramentos por PCR (incluindo alguns custos aproximados).....	76

# 1 INTRODUÇÃO

O lançamento de esgotos domésticos e industriais *in natura* em corpos d'água tem sido um dos fatores mais importantes e preocupantes de interferência antrópica no ambiente, causando impactos extremamente nocivos à saúde humana e aos ecossistemas, notadamente os aquáticos. Tecnologias avançadas de tratamento têm sido pesquisadas, principalmente nos países desenvolvidos, com o intuito adicional de recuperação e reúso dos recursos hídricos. Nos países em desenvolvimento como o Brasil, tais pesquisas são essenciais para a mudança do crítico quadro sanitário.

No Brasil, os registros do Sistema Único de Saúde (SUS) mostram que 80% das internações hospitalares do país são devidas às doenças de veiculação hídrica ou doenças transmitidas através da água, tais como diarréias. Um corpo d'água que recebeu esgotos com dejetos humanos pode constituir-se em veículo de transmissão de várias doenças, tais como febre tifóide, cólera, disenteria bacilar, amebíase, dentre outras (SOUZA *et al.*, 2002).

Nas últimas décadas, o tratamento de águas residuárias por meio dos reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB - *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) tem apresentado notável aceitação. No Brasil, esses reatores constituem-se na principal tendência de tratamento de esgotos como unidades únicas ou seguidas de alguma forma de pós-tratamento (CHERNICHARO, 1997). O pós-tratamento de efluentes dos reatores UASB é necessário, pois normalmente não conduz ao atendimento aos padrões de qualidade exigidos pela legislação ambiental brasileira para efluentes e corpos de água, como por exemplo, a Resolução Conama 357/05 e a maioria das legislações estaduais.

Uma tecnologia de pós-tratamento do efluente de reatores anaeróbios, atualmente consolidada no país e em outros países com clima tropical, é o sistema de lagoas de polimento (LP). Tais lagoas são dimensionadas de forma a otimizar a ocorrência da interação de diversos fatores, tais como temperatura, insolação, pH, escassez de alimento, entre outros, na remoção de organismos patogênicos. Além de se ter a efetiva remoção de patógenos nas lagoas de polimento, alcança-se ainda certo polimento na qualidade do efluente, em termos de remoção de matéria orgânica e amônia (von SPERLING, 2005). O decaimento de bactérias patogênicas é usualmente interpretado por dados de monitoramento do grupo indicador “coliformes”.

As impossibilidades operacionais, econômicas e técnicas de se avaliar sistematicamente os diversos agentes etiológicos causadores de patologias veiculados nas águas impôs a adoção do grupo “coliforme” e da bactéria *Escherichia coli* como indicadores de possível contaminação de origem fecal nas águas e nos alimentos. Tais indicadores não são necessariamente patogênicos, mas fornecem uma indicação satisfatória de quando uma água apresenta contaminação recente por fezes humanas ou de animais e, por conseguinte, da sua potencialidade para transmitir doenças de origem fecal, uma vez que tais indicadores têm como habitat natural mais freqüente o intestino humano e animal.

O parâmetro “coliforme”, além de indicar a potencialidade de um efluente transmitir doenças, é também o mais utilizado para a avaliação da remoção de patógenos nas estações de tratamentos de esgotos. No entanto, sabe-se que outros microrganismos patogênicos podem estar presentes e que deveriam ser monitorados de modo a avaliar se o sistema de tratamento também está sendo eficiente para a remoção destes. O lançamento de efluentes tratados com baixos teores de coliformes pode ainda estar associado à presença de outros organismos patogênicos, tais como vírus, cistos de protozoários, ovos de helmintos e outras bactérias (GUZEWICH e MORSE, 1986).

Assim, é desejável que a inferência do parâmetro “coliformes” na indicação da qualidade bacteriológica da água deve ser acompanhada por monitoramentos adicionais dos principais patógenos de veiculação hídrica.

Os reatores UASB, seguidos pelas lagoas de polimento, constituem sistemas simplificados e econômicos de tratamento de esgotos capazes de alcançar elevada eficiência na remoção de matéria orgânica e de organismos patogênicos (indicado pelo decaimento do número de coliformes e ovos de helmintos). O monitoramento de coliformes ao longo do sistema mostra um decaimento de cerca de 4 unidades logarítmicas, podendo chegar a  $10^3/100\text{mL}$  de *Escherichia coli* no efluente final (ANDRADA, 2005). Acredita-se que o sistema UASB-LP remova bactérias patogênicas que estão no esgoto bruto e não estimule o desenvolvimento de outros patógenos oportunistas no decorrer das unidades. No entanto, para testar tal hipótese, é necessária a realização de análises detalhadas dos microrganismos patogênicos presentes, antes, durante e após o tratamento.

Com a difusão de técnicas baseadas em biologia molecular, tem sido possível investigar a presença ou ausência de microrganismos patogênicos em uma diversidade de amostras, seja

na área alimentar, de saúde ou na área ambiental. Estas técnicas apresentam vantagens quando comparadas às técnicas tradicionais de cultivo, principalmente no que se refere à sensibilidade das análises e relativa rapidez.

Assim, com o objetivo de atender a deficiência no conhecimento sobre bactérias potencialmente patogênicas no sistema de tratamento UASB-LP, bem como de atender a demanda pela introdução de novas metodologias na investigação dos microrganismos patogênicos, o presente trabalho foi proposto.

Foram determinadas as seguintes espécies de bactérias potencialmente patogênicas para serem investigadas no presente estudo: *Salmonella typhimurium*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Shigella dysenteriae*, *Shigella* spp., *Helicobacter pylori*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica*. A escolha para investigação de tais bactérias foi realizada com base na revisão da literatura que indica que estas são as bactérias patogênicas mais comuns em sistemas de tratamento de esgoto.

Ressalta-se que o decaimento dos organismos investigados ao longo do sistema de tratamento não será contemplado nesse estudo, já que para isso haveria necessidade de geração de dados quantitativos, ao passo que a presente pesquisa foi realizada com metodologia que fornece apenas dados qualitativos. Porém, os resultados da pesquisa fornecerão indicações sobre as bactérias que poderiam ser monitoradas e quantificadas em trabalhos futuros a fim de determinar sua taxa de decaimento ao longo do sistema. É importante destacar que esta dissertação faz parte de um projeto maior intitulado “Remoção de patógenos, nitrogênio e enxofre em sistemas simplificados de pós-tratamento de esgotos” (TEC946), o qual envolve a quantificação das bactérias patogênicas no sistema UASB-Lagoas de polimento.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo Geral*

Investigar a ocorrência de bactérias potencialmente patogênicas, ao longo de um sistema de tratamento de esgoto, composto por reator UASB e lagoas de polimento (UASB-LP), utilizando a técnica da PCR (Reação em cadeia da DNA polimerase).

### 2.2 *Objetivos específicos*

- Desenvolver uma metodologia de coleta e concentração de amostras dos efluentes das lagoas de polimento e adaptar um protocolo de extração de DNA para amostras do esgoto bruto e dos efluentes do sistema UASB-LP.
- Determinar as condições de amplificação do DNA extraído das amostras do sistema UASB-LP pela técnica da PCR, utilizando culturas puras de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp., *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica*.
- Aplicar a técnica da PCR para monitorar a presença das bactérias *Salmonella typhimurium*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Shigella dysenteriae*, *Shigella* spp., *Helicobacter pylori*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica* em amostras de esgoto bruto e dos efluentes do sistema UASB-LP.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### **3.1 UASB e Lagoas de polimento no tratamento biológico de esgotos domésticos**

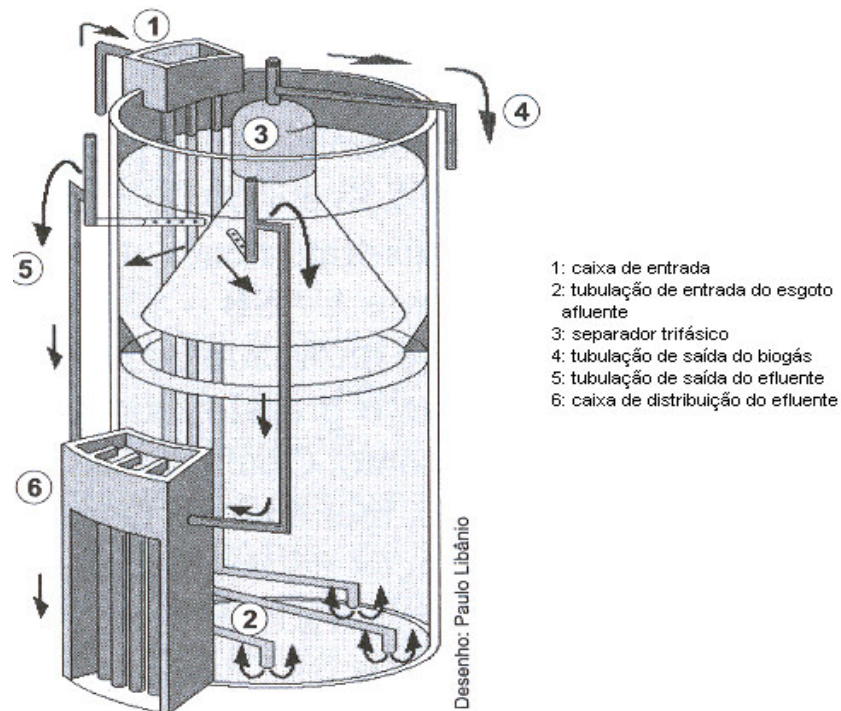
O tratamento biológico de esgotos se faz completamente por mecanismos biológicos, como o próprio nome sugere. Esses mecanismos reproduzem, de certa forma, os processos naturais que ocorrem em um corpo d'água, após o lançamento de despejos (von SPERLING, 2005).

O tratamento dos esgotos é fundamental devido ao seu potencial poluidor. Caso não seja dada destinação apropriada aos esgotos, estes acabam poluindo o solo, contaminando águas superficiais e subterrâneas e passam a escoar a céu aberto, tornando-se perigosos focos de disseminação de doenças. Além do mais, existe o risco do impacto ecológico ao serem lançados nos corpos receptores. Em alguns casos, o meio aquático demonstra ter condições de receber e decompor os contaminantes até um nível que não cause problemas ou alterações acentuadas que prejudiquem o ecossistema. Entretanto, nos casos de sobrecarga orgânica, os esgotos provocam total degradação do ambiente, dependendo do corpo receptor, em decorrência do consumo excessivo do oxigênio dissolvido por microrganismos heterótrofos aeróbios (bactérias principalmente) (ABREU, 2007).

Em 1893 e 1914, foram iniciadas as tecnologias de tratamento de esgotos em ambiente confinado conhecidas como tanques sépticos e lodos ativados, respectivamente. Recentemente, os processos anaeróbios têm sido empregados como unidades principais para remoção de carbono orgânico de esgotos, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (FORESTI *et al.*, 2006).

Reatores de fluxo ascendente e manta de lodo, tipicamente conhecidos como UASB, foram um dos avanços mais importantes na tecnologia de digestão anaeróbia. Estes reatores foram desenvolvidos pelo professor Gatzke Lettinga e colaboradores, na Universidade de Wageningen, Holanda, na década de 80. De acordo com von Sperling (2005), o funcionamento do reator se dá da seguinte maneira: o processo de digestão de esgoto em reatores UASB consiste essencialmente de um fluxo ascendente de esgotos através de um leito de lodo denso (bactérias anaeróbias) e de elevada atividade. O perfil de sólidos no reator varia de muito denso e com partículas de elevada capacidade de sedimentação, próximas ao fundo (leito de lodo), até um lodo mais disperso e leve, próximo ao topo do reator (manta de

lodo). Neste reator a biomassa cresce dispersa no meio líquido, permanecendo retida no sistema por tempo suficientemente elevado (usualmente superior a 30 dias, quando então é feito o descarte do lodo excedente) para que a estabilização ocorra em seu interior. A Figura 3.1 apresenta o esquema de um reator UASB circular de pequeno porte (semelhante ao usado nesta pesquisa).



**Figura 3.1** - Representação esquemática de um reator UASB cilíndrico, de pequeno porte (250 habitantes). Fonte: von Sperling, 2005.

A matéria orgânica é convertida anaerobiamente por bactérias dispersas no reator em forma de grânulos. Como resultado da atividade anaeróbia são formados gases (principalmente metano e gás carbônico). As bolhas de gás formadas apresentam um movimento ascendente e, juntamente com o fluxo ascensional, garantem a mistura que permite um maior contato entre a biomassa e o substrato.

De forma a reter a biomassa no sistema, impedindo que saia com o efluente, a parte superior do reator apresenta uma estrutura cônica ou piramidal que possibilita a separação e acúmulo de gás e a separação e retorno dos sólidos (biomassa) que sobem junto ao gás e o líquido. O

gás é coletado na parte superior deste separador trifásico, de onde pode ser queimado ou reaproveitado.

No entorno e acima do separador trifásico, configura-se o compartimento de decantação, no qual os sólidos sedimentam, escorregando pelas suas paredes e retornando ao reator. Este retorno dos sólidos é que garante a retenção no sistema da biomassa de elevada atividade, resultando em elevados tempos de residência celular (idade do lodo), bem superiores aos tempos de detenção hidráulica .

Atualmente, o Brasil assiste a um aumento crescente em relação à implantação de estações de tratamento de esgotos. Este incremento no atendimento à população por sistemas de tratamento de esgotos tem sido efetivado principalmente por meio de sistemas anaeróbios, notadamente reatores do tipo UASB. Estes sistemas apresentam diversas características favoráveis, tais como, o baixo custo operacional e de implantação, baixos requisitos de área, baixo consumo de energia e aplicabilidade em pequena e grande escala (CHERNICHARO, 1997).

Entretanto, os reatores anaeróbios dificilmente produzem um efluente que atende aos padrões estabelecidos pela legislação ambiental brasileira (MASCARENHAS *et al.*, 2004). Torna-se necessário, portanto, o pós-tratamento dos esgotos resultantes de reatores anaeróbios, como uma forma de adequar o efluente tratado aos requisitos da legislação ambiental e propiciar a proteção dos corpos de água receptores dos lançamentos dos esgotos.

Portanto, o tratamento convencional de esgoto doméstico por meio de reator UASB procura melhorar a qualidade do efluente e do corpo d'água receptor, mas não é suficiente para retirar todos os contaminantes da água poluída. O esgoto tratado pode ainda conter microrganismos patogênicos, o que exige um pós-tratamento e uma destinação adequada do efluente para se interromper o ciclo de transmissão das doenças de veiculação hídrica. Dentre as tecnologias de pós-tratamento do efluente de reatores anaeróbios que atualmente se encontram mais consolidadas no Brasil estão as lagoas de polimento (von SPERLING, 2002). A Tabela 3.1 apresenta as principais vantagens e desvantagens do uso de lagoas de polimento.

O principal papel do pós-tratamento é o de completar a remoção da matéria orgânica, bem como o de proporcionar a remoção de constituintes pouco afetados no tratamento anaeróbio, como os nutrientes (N e P) e os organismos patogênicos (vírus, bactérias, protozoários e

helminthos) (CHERNICHARO *et al.*, 2001), e conseqüentemente, adequar a qualidade do efluente anaeróbio às características exigidas pelas legislações ambientais vigentes para lançamento em águas de superfície ou uso em culturas irrigadas, sem que haja impacto adverso no meio ambiente.

**Tabela 3.1 – Vantagens e desvantagens das lagoas de polimento**

<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Elevada remoção de coliformes.	Necessidade de grandes áreas
Lenta acumulação de lodo no fundo.	Possível necessidade de remoção de algas do efluente
Elevada remoção de nutrientes (NH <sub>3</sub> factível sob condições favoráveis).	Em lagoas mais rasas pode haver o crescimento de vegetações emergentes
Não há problemas de mau cheiro	Devido ao crescimento de vegetação pode haver a proliferação de mosquitos
Pode ser implantada próxima aos centros urbanos	Necessidade de um afluente com baixa concentração de matéria orgânica e sólidos

Fonte: Adaptado de Mascarenhas (2002)

As lagoas de polimento recebem um efluente no qual a matéria orgânica e os sólidos em suspensão foram drasticamente reduzidos no pré-tratamento e, portanto, a DBO está em grande parte estabilizada.

Devido à eficiente remoção do material coloidal no reator UASB, o efluente apresenta baixa turbidez, garantindo a penetração da luz solar na maior parte da coluna d'água, acelerando a fotossíntese e a produção de oxigênio que se faz presente em toda massa líquida. Como o efluente apresenta baixa carga orgânica, a taxa de oxidação bacteriana também é baixa. A taxa de oxidação reduzida, associada à alta taxa de produção fotossintética de oxigênio, leva a prevalência da fotossíntese sobre a oxidação bacteriana (CATUNDA e van HAANDEL, 1996).

Portanto, de acordo com van Haandel e Lettinga (1994), em similaridade às lagoas de maturação, nas lagoas de polimento tem-se um ambiente predominantemente aeróbio. Por esta razão, o objetivo das lagoas de polimento deixa de ser a redução da concentração de material orgânico ou dos sólidos em suspensão, passando a ser a redução do número de organismos patogênicos e, eventualmente, da concentração de nutrientes.

Os principais nutrientes presentes nos esgotos, além da matéria orgânica carbonácea, são o nitrogênio e o fósforo. As lagoas de polimento apresentam condições favoráveis para a remoção de nutrientes, pois nesse ambiente há uma predominância da fotossíntese sobre os

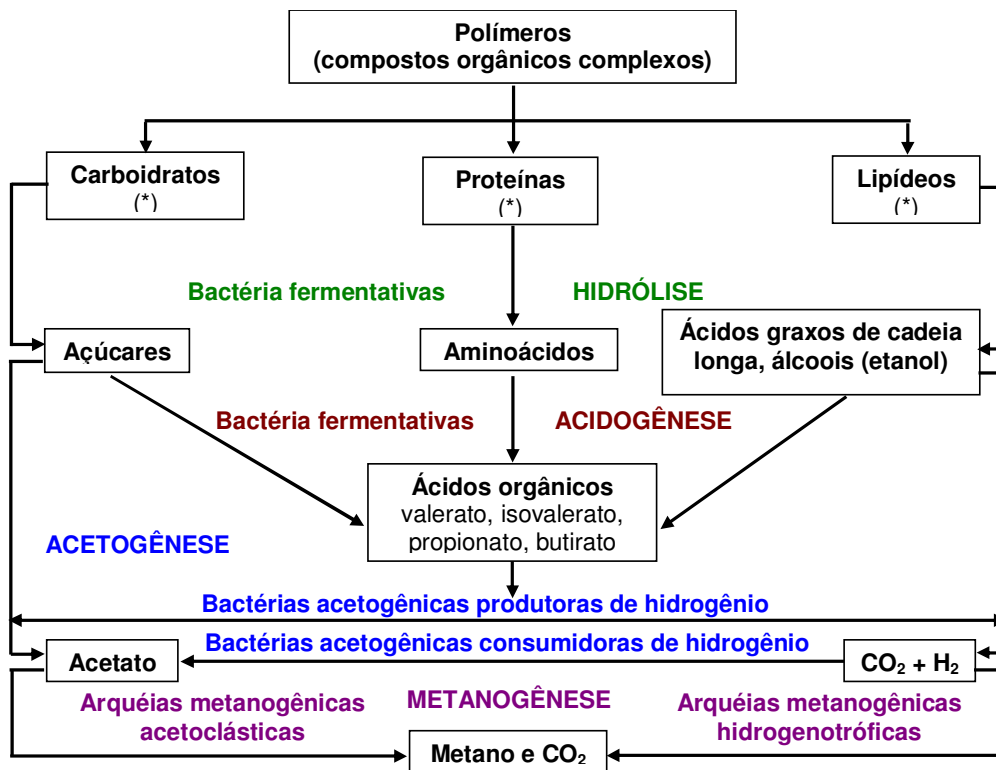
processos de estabilização da matéria orgânica, resultando num aumento do pH no meio. Um pH elevado permite a remoção de nutrientes por processos físicos e químicos, como é o caso da volatilização da amônia e a precipitação de fosfatos.

Esses nutrientes são também reduzidos nas lagoas devido à assimilação da amônia e nitratos pelas algas e a própria retirada do fósforo orgânico contido nas algas e nas bactérias por meio da saída com o efluente final.

Nem sempre é conveniente remover os nutrientes do esgoto. A remoção de nutrientes só é vantajosa quando o efluente é lançado em águas de superfície. Neste caso, é importante reduzir ao máximo o teor de nutrientes, para evitar o crescimento exacerbado de algas, que pode prejudicar a qualidade da água devido ao processo de eutrofização. No caso de se usar o efluente para irrigação, acontece o contrário. Há um interesse de se conservar os nutrientes, uma vez que estes poderão substituir os nutrientes de fertilizantes químicos (CAVALCANTI *et al.*, 2001).

### **3.1.1 Atividade biológica em reatores UASB e lagoas de polimento**

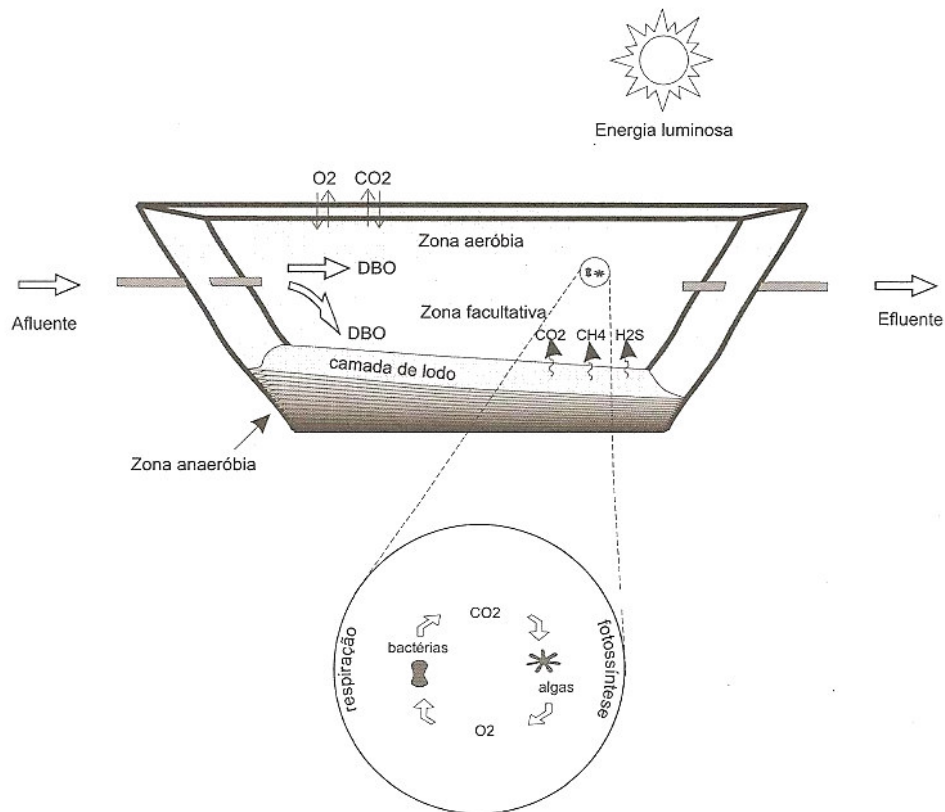
Nas águas residuárias, há uma enorme variedade de compostos orgânicos biodegradáveis, o que resulta na existência de uma comunidade microbiana muito diversificada, responsável pela degradação dos diferentes compostos. Ao contrário da degradação aeróbia, na qual a matéria orgânica carbonácea é usualmente metabolizada diretamente à CO<sub>2</sub>, a degradação anaeróbia envolve 4 etapas distintas (hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese). Por se tratar de um material constituído de proteínas, carboidratos e lipídeos, vários são os caminhos metabólicos possíveis durante a conversão dos compostos a metano, realizados principalmente por microrganismos heterótrofos. Portanto, trata-se de um processo bioquímico complexo, composto de várias reações seqüenciais, cada uma com determinadas populações microbianas. A Figura 3.2 apresenta as etapas metabólicas e os microrganismos envolvidos no processo da degradação da matéria orgânica à metano.



**Figura 3.2** - Etapas metabólicas e microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia da matéria orgânica à metano. Fonte: Abreu, 2007.

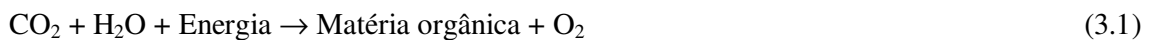
(\*) exoenzimas que degradam carboidratos: celulase, hemicelulase, xilanase, amilase;  
 exoenzimas que degradam proteínas: proteases;  
 exoenzimas que degradam lipídeos: lipase, fosfolipase.

Segundo Cavalcanti *et al.* (2001), numa lagoa de polimento, a concentração de vários constituintes do esgoto digerido muda com o tempo, por causa de processos biológicos, químicos e físicos que se desenvolvem. Os processos biológicos mais importantes são: fotossíntese; oxidação da matéria orgânica por bactérias aeróbias e a fermentação da matéria orgânica durante a digestão anaeróbia. A Figura 3.3 apresenta os processos biológicos que ocorrem numa lagoa facultativa durante o tratamento de esgotos.

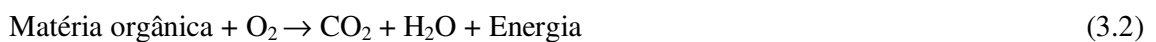


**Figura 3.3** - Processos biológicos da remoção da matéria orgânica em lagoas facultativas.  
 Fonte: von Sperling, 2005.

O processo da fotossíntese é realizado pelas algas presentes nas lagoas e depende de uma fonte de energia luminosa. Nesse caso, as algas utilizam a energia solar para reduzir o dióxido de carbono transformando-o em material orgânico celular, liberando assim, o oxigênio no meio. A Equação 3.1 pode representar de maneira simplificada esse processo:



As bactérias aeróbias, então, utilizam o oxigênio liberado pelas algas após a fotossíntese para oxidar a matéria orgânica remanescente ao tratamento anterior realizando, dessa forma, o processo de respiração aeróbia. A respiração aeróbia bacteriana pode ser representada pela equação 3.2:



As taxas relativas com que ocorrem os dois processos biológicos anteriores afetam diretamente parâmetros importantes, como a concentração de oxigênio dissolvido (OD), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), demanda bioquímica de oxigênio (DBO<sub>5</sub>), demanda química de oxigênio (DQO), sólidos em suspensão (SS) e pH, enquanto outros são afetados indiretamente, como a alcalinidade e a concentração dos nutrientes nitrogênio (N) e fósforo (P) (CAVALCANTI *et al.*, 2001).

O último processo é a digestão anaeróbia, que nas lagoas de polimento se restringe à camada de lodo no fundo, entretanto devido à pequena profundidade das lagoas, o oxigênio dissolvido pode chegar até às camadas mais profundas, dificultando a realização desse processo. O processo anaeróbio pode ser representado esquematicamente pela equação 3.3:



O efluente de lagoas de polimento normalmente apresenta baixos valores de DQO filtrada, porém, devido à abundante presença de algas, a DQO total apresenta valores relativamente elevados. Também em relação à DBO, verifica-se a influência da abundante presença de algas no efluente, uma vez que a DBO filtrada corresponde a uma fração de 50 a 65% da DBO total, estando a cargo do material particulado (constituído predominantemente de algas) os restantes 35 a 50%. A baixa eficiência das lagoas de polimento em termos de remoção de sólidos em suspensão também é devida à presença de algas (CAVALCANTI *et al.*, 2001).

Deve-se levar em conta que a utilização de um tratamento prévio eficiente, como nos reatores UASB, promove a remoção de praticamente toda a matéria orgânica de fácil degradabilidade, o que certamente dificulta a remoção da DBO na lagoa de polimento, levando a baixos coeficientes de remoção (von SPERLING, 2002).

### **3.2 Remoção de microrganismos patogênicos em sistema UASB e lagoas de polimento**

Os organismos patogênicos geralmente presentes nos esgotos domésticos são os vírus, bactérias, protozoários e ovos de helmintos. Segundo Uehara e Vidal (1989), em lagoas de estabilização, as bactérias patogênicas geralmente encontradas pertencem aos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Leptospira* e *Vibrio*.

Devido aos baixos tempos de detenção nos reatores anaeróbios, a remoção de organismos patogênicos nestes sistemas é baixa, e está associada à remoção de bactérias associadas aos sólidos suspensos presentes no esgoto, devido ao mecanismo de retenção de sólidos.

Ao contrário, as lagoas de polimento exercem bem a função de remoção de patógenos, sendo esta uma das suas principais finalidades (von SPERLING, 2005). Conforme exposto por Andrade Neto (1997), nessas lagoas, a remoção de organismos patogênicos se dá pelo tempo de exposição destes organismos às condições consideradas adversas a sua sobrevivência, as quais são: temperatura elevada; efeito bactericida dos raios ultravioleta do sol; condições aeróbias (principalmente em níveis de saturação de O<sub>2</sub>); redução do substrato; competição; predação pelo zooplâncton; pH elevado; existência de certos compostos tóxicos para algumas bactérias; combinação de vários destes fatores.

Segundo Shuval e Fattal (2003), as lagoas de polimento são dimensionadas otimizando parâmetros que favorecem o decaimento de bactérias patogênicas, tais como: pH (entre 8 e 9), temperatura (até 40°C), insolação (raios UV), e em menor proporção a escassez de alimentos, e predação. Além de bactérias as lagoas, de maneira geral, atingem eliminação total de helmintos, cistos e ovos por sedimentação (von SPERLING, 2005).

A eficiência das lagoas no decaimento de microrganismos fecais (principalmente enterobactérias e vírus fecais) é atribuída principalmente à elevação do pH causada pelo metabolismo das microalgas. Em lagoas de polimento, cerca de 80% do oxigênio dissolvido é produzido por algas, o que estimula a oxidação aeróbia da matéria orgânica a CO<sub>2</sub>, que é então assimilado pelas algas. O principal efeito da atividade fotossintetizante é a alteração do pH ocasionado pelo consumo de CO<sub>2</sub> pelas algas e conseqüentemente, acúmulo do íon hidroxila, segundo a reação 3.4:



Assim, a atividade fotossintética das algas ocasiona um aumento no pH, entre 8,0 e 9,0 durante o dia, e este alto pH é letal para a maioria das bactérias (PEARSON, 2003). Em lagoas, valores de pH igual ou acima de 9,4 induzem rapidamente a morte das bactérias fecais (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*), exceto as *Vibrio cholerae* as quais são resistentes a altos valores de pH (ANDRADE NETO, 1997).

O efeito negativo de alto pH para bactérias pode estar relacionado tanto à diminuição da atividade enzimática quanto à ineficiência de um dos sistemas de geração de energia (força próton-motora), que depende totalmente do acúmulo de prótons na parte externa da membrana da bactéria (MADIGAN *et al.*, 2004). Desta forma, a geração de energia é menor, o que pode comprometer a locomoção, alimentação e divisão celular das células, promovendo desta forma, o decaimento no número de bactérias.

A concentração de oxigênio dissolvido pode também contribuir para a remoção das bactérias patogênicas devido à sensibilidade apresentada por algumas espécies a altos teores de OD, tais como as espécies microaerofílicas *Helicobacter pylori* e *Campylobacter jejuni* (CURTIS, 2003).

Por fim, as lagoas de polimento, como unidades de pós-tratamento, devem atingir elevadas eficiências na remoção dos coliformes ( $E > 99,9$  ou  $99,99\%$ ), para que possam ser cumpridos os requisitos para utilização do efluente na irrigação, ou os padrões para corpos d'água em função da classe a que pertençam (von SPERLING, 2005).

### **3.3 Organismos indicadores de contaminação fecal**

Os organismos associados ao trato gastrointestinal de animais e humanos são os que mais despertam interesse no saneamento, pois podem funcionar como indicadores de contaminação fecal se encontrados fora do habitat natural. Assim, a presença destes organismos em amostras naturais é um forte indicador de contaminação fecal direta ou contaminação proveniente de esgotos domésticos.

Dentre estes organismos, destacam-se as bactérias de origem entérica. Algumas fazem parte do trato gastrointestinal de animais e humanos e outras são patogênicas e/ou oportunistas, parasitando o trato gastrointestinal. A maioria pertence às famílias *Enterobacteriaceae* e *Enterococcaceae*. Entre as enterobactérias, destacam-se os gêneros: *Escherichia*, *Salmonella* e *Shigella*, dentre outras. No grupo das *Enterococcaceae*, destaque para o gênero *Enterococcus* (TORTORA *et al.*, 2005).

Com o advento das práticas de saneamento, o grupo “coliformes totais” foi adotado como bons indicadores da qualidade da água e da eficiência do tratamento dos esgotos domésticos. Dentre as características do grupo destacam-se: i) o fato de serem encontrados em elevadas

quantidades nas fezes humanas; ii) a maioria das cepas não serem patogênicas; iii) serem de detecção relativamente rápida e parcialmente econômica.

Porém, dentro do grupo dos coliformes totais, existem gêneros que não são exclusivamente de origem fecal. Esta constatação levou ao desenvolvimento de métodos que pudessem enumerar o subgrupo denominado coliformes fecais dos não fecais. Estas metodologias foram adotadas baseando-se no parâmetro temperatura, uma vez que os chamados coliformes fecais (termotolerantes) tinham a capacidade de fermentar a lactose a temperatura elevada ( $44,5^{\circ} \pm 0,2^{\circ} \text{C}$  em  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ ) (APHA, 1998).

Ainda que a utilização dos coliformes termotolerantes em substituição aos totais tenha determinado uma melhoria significativa na detecção da contaminação fecal, logo se tornou evidente a existência de outros coliformes, também termotolerantes e que não são de origem fecal. Dentre estes grupos podem-se citar os gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*, provenientes de contribuição ambiental (ALONSO, 1999). Ainda assim, não se pode ignorar a existência de outros gêneros de bactérias patogênicas “não-coliformes” nos esgotos domésticos em níveis consideráveis, causadores de disenterias e infecções intestinais, principalmente em crianças.

Atualmente, *E. coli* é apontada como o principal componente fecal detectado em águas como sendo de ocorrência exclusivamente de origem humana e animal. Em face disso, *E. coli* foi estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), dentro do grupo das bactérias, como principal indicador microbiológico de contaminação fecal, sendo assim um critério de padrão de qualidade das águas, ainda que somente algumas espécies sejam patogênicas (BASTOS *et al.*, 2003).

Embora as bactérias do grupo “coliformes” sejam os principais indicadores de contaminação fecal em amostras de ambientes naturais, no caso dos esgotos, a presença fecal é bastante óbvia e não necessitaria ser pesquisada. A maior utilidade dos coliformes, no tratamento dos esgotos, passa a ser para a inferência da eficiência de remoção dos organismos patogênicos que têm mecanismos de remoção semelhantes aos coliformes, neste caso, as bactérias patogênicas e vírus.

No entanto, avaliar a remoção de um amplo espectro de organismos patogênicos por meio de um simples indicador traz, naturalmente, limitações. O ideal seria avaliar a qualidade

bacteriológica do efluente tratado por meio de análises específicas das principais bactérias patogênicas de veiculação hídrica.

Tendo por base os comentários acima, torna-se evidente a necessidade de investigação mais completa dos organismos patogênicos no tratamento de esgotos, já que a avaliação somente do grupo “coliformes” pode não estar relacionada com ausência de outras bactérias patogênicas, cuja presença poderia constituir-se em um risco para a saúde.

Porém, avaliar a qualidade bacteriológica do esgoto, enfatizando cada possível grupo bacteriano potencialmente patogênico por meio de técnicas convencionais de cultivo e isolamento, seria laborioso, devido ao fato de algumas bactérias serem bastante seletivas quanto aos meios, tais como *Helicobacter pylori* e *Campylobacter* spp. Diante disso, a aplicabilidade da técnica PCR para se avaliar a qualidade bacteriológica do esgoto seria uma boa alternativa, já que este método é independente de cultivos e mais preciso do que as demais técnicas de cultivo e isolamento.

### **3.4 Principais doenças de veiculação hídrica e bactérias patogênicas associadas**

A determinação da presença de patógenos bacterianos ou indicadores de contaminação de origem fecal em águas é necessária para a avaliação e segurança da saúde pública, de modo que se possam adotar estratégias de controle que sejam realmente eficazes. As doenças de veiculação hídrica causam sérios danos à sociedade devido ao seu potencial de infectar grande número de pessoas em curto tempo. A Tabela 3.2 apresenta as principais doenças bacterianas de veiculação hídrica, o agente causador e a dose infectante.

**Tabela 3.2** - Principais doenças de veiculação hídrica associadas a bactérias, agente causador e dose infectante\*

Doença	Agente causador	Dose infectante (organismos)	Manifestações clínicas
Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>	10 <sup>6</sup>	Diarréia severa, desidratação.
Salmonelose	<i>Salmonella</i> spp.	10 <sup>5</sup> -10 <sup>9</sup>	Diarréia aquosa, desconforto abdominal, náusea, vômito e febre em criança.
Gastroenterite ou campilobacteriose	<i>Campylobacter jejuni</i>	<500	Diarréia aquosa, sempre com dor abdominal, náusea, vômito e febre em crianças.
Disenteria ou shigelose	<i>Shigella</i> spp.	10 a 10 <sup>2</sup>	Diarréia sanguinolenta, dor abdominal, dor retal. <i>S. dysenteriae</i> - produz uma toxina causando a síndrome hemourêmica.
Febre tifóide	<i>Salmonella typhi</i>	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>5</sup>	Cansaço, dor de cabeça, dor abdominal, temperatura elevada. Sintomas gastrointestinais (≈ 4% de óbitos).
Colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica	<i>E. coli</i> O157: H7 (cepa EHEC)	Desconhecida (provavelmente similar a <i>Shigella</i> )	Doença sistêmica, quadro de diarréia, principalmente em crianças menores de 10 anos.
Úlcera péptica e câncer gástrico	<i>Helicobacter pylori</i>	Desconhecida, ≈10 <sup>5</sup>	Úlcera estomacal ou duodenal. Câncer.

Fonte: Adaptado de Schroeder e Wuertz (2003)

\* em indivíduos imunocompetentes

A seguir, uma breve descrição das bactérias patogênicas associadas às principais doenças de veiculação hídrica.

### 3.4.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* é a espécie bacteriana mais comum que habita a flora do trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente e estão associadas as fezes, e por isso é usada como indicador de contaminação fecal em água e alimentos. Grande parte das cepas de *Escherichia coli* são comensais ou mutualísticas inofensivas (LECLERC *et al.*, 2001; TORTORA *et al.*, 2005), sendo, porém um patógeno oportunista. Mas, ainda associadas às fezes podem existir outras espécies ou outras cepas de *E. coli* que causam síndromes diarréicas distintas devido aos seus fatores de virulência.

Até 1982, não havia sido reportadas cepas patogênicas de *Escherichia coli*. Todas as linhagens patogênicas atualmente conhecidas atuam, inicialmente, no intestino, sendo algumas das linhagens caracterizadas por sua capacidade de produzir potentes toxinas. Somente algumas cepas causam doenças diarréicas. Dentre as linhagens diarreio gênicas de *E. coli*, seis categorias são conhecidas e classificadas de acordo com as características de patogenicidade. São elas, *E. coli* enterotoxigênica, enterohemorrágica, enteroinvasiva, enteropatogênica, enteroagregativa e *E. coli* difusamente aderente, conhecidas pelas siglas:

EPEC, EHEC, EIEC, EPEC, EAEC e DAEC, respectivamente (LECLERC *et al.*, 2001; TALLON *et al.*, 2005). A linhagem ETEC é uma causa comum de diarreia infecciosa. Em adultos, é uma das causas mais comuns da doença conhecida como “diarreia dos viajantes”, pois acomete principalmente pessoas que viajam de regiões desenvolvidas para regiões subdesenvolvidas do mundo (WOLF, 1997).

Todas as cepas patogênicas de *E. coli* causam colite hemorrágica, mas a mais severa delas se refere a *E. coli* sorotipo O15:H7, causadora da síndrome hemolítica urêmica pela produção da enterotoxina típica de *Shigella* que inibe a produção de proteínas e induz a perda de fluido das células epiteliais do intestino.

Surtos de *E. coli* O15:H7 têm sido reportados mundialmente, principalmente devido a ingestão de carnes mal-cozidas. Já a presença desta bactéria em água e esgoto é pouco investigada. Um surto foi reportado no Canadá ocasionando a morte de 6 pessoas devido a contaminação da água de um sistema de abastecimento por *E. coli* O15:H7 (SCHROEDER e WUERTZ, 2003). Segundo Maule (2000), é razoável assumir que esgotos domésticos irão conter esta bactéria pelo menos esporadicamente, refletindo a incidência da infecção na comunidade.

Embora a transmissão de *E. coli* através da água seja abrandada pela sua diluição, ainda assim é capaz de causar doença quando ingerida, devido à baixa dose infectante necessária para que essa linhagem ocasione doença. A dose infectante não é totalmente conhecida, variando entre as linhagens, sendo que somente cerca de duzentos microrganismos são capazes de desencadear a doença (SCHROEDER e WUERTZ, 2003).

### **3.4.2 *Shigella* spp.**

O gênero *Shigella* é representado por bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não dotados de motilidade, e muito próximos, filogeneticamente, da *Escherichia coli*. Dentre as espécies conhecidas de *Shigella*, quatro são reconhecidas como causadoras de doenças em humanos i) *S. dysenteriae*, ii) *S. flexneri*, iii) *S. boydii* iv) *S. sonnei*. A primeira espécie é a mais patogênica, sendo que as quatro espécies variam sua distribuição ao redor do mundo.

A disenteria causada por *Shigella* spp. é uma das infecções mais comuns em países em desenvolvimento, nos quais predominam baixos padrões de saneamento básico (PENG *et al.*, 2002). Este gênero constitui-se em um dos agentes etiológicos mais importantes da diarreia

aguda, principalmente em crianças, mas também acomete adultos com frequência. A shigelose ou disenteria bacilar atinge principalmente crianças de um a quatro anos de idade e idosos, porém em surtos epidêmicos, todas as faixas etárias podem ser acometidas. A dose infectante da doença é baixa em relação à salmonelose, variando de  $10^1$  a  $10^2$  (células), com elevada taxa de letalidade. Os sintomas são médios ou graves, dependendo da espécie envolvida. Shigelose é usualmente endêmica em condições precárias de saneamento e de higiene pessoal e domiciliar, sendo a endemicidade normalmente associada à transmissão feco-oral, por contato pessoal, cujos surtos podem estar associados à veiculação hídrica.

Sua “semelhança fisiológica” com *Escherichia coli* e com salmonelas, associadas a menores densidades usualmente presentes, dificulta seu isolamento e identificação por métodos tradicionais. Recentemente, a biologia molecular tem sido reconhecida como uma ferramenta muito útil na identificação de gêneros, espécies e subespécies deste grupo (PENG *et al.*, 2002, REGNAULT *et al.*, 2000).

### **3.4.3 *Salmonella* spp.**

Quase todos os membros do gênero *Salmonella* são potencialmente patogênicos. As salmonelas são comensais do trato intestinal de vários animais, sobretudo aves e bovinos e reservatórios de infecção humana. Quando se verificam condições sanitárias precárias, elas podem contaminar os alimentos. A infecção ocasionada por *Salmonella* é iniciada na mucosa intestinal e algumas espécies se disseminam por outros órgãos, ao contrário da *Shigella*, causando choque séptico, principal causa das mortes, sobretudo em crianças.

As espécies mais virulentas são a *Salmonella typhi* e *Salmonella paratyphi*, causadoras das febres tifóides e paratífóides, respectivamente. A espécie *Salmonella typhimurium* é considerada uma das principais bactérias causadoras de uma doença gastrointestinal menos grave nos animais e no homem em todo o mundo, conhecida como salmonelose.

No Brasil, cepas de *Salmonella typhimurium* foram isoladas de alimentos para consumo humano. O uso indiscriminado de antibióticos em produtos agrícolas e no tratamento de pacientes tem contribuído para aumentar a multiresistência dessas cepas a diversos antimicrobianos (PEREIRA *et al.*, 2007).

### 3.4.4 *Enterococcus* spp.

Espécies do gênero *Enterococcus* passaram por recentes mudanças taxonômicas, já que antigamente faziam parte do gênero *Streptococcus*. Estudos filogenéticos baseados nas análises da seqüência do rDNA 16S mostraram que as espécies de *Enterococcus* estavam distantemente relacionadas das outras espécies do grupo em questão (LUDWIG *et al.*, 1985). Com isso, os enterococos passaram a ser considerados um gênero à parte.

As espécies de *Enterococcus* são adaptadas às áreas do corpo ricas em nutrientes, mas pobres em oxigênio, como o trato gastrointestinal de animais e humanos e atuam como patógenos oportunistas em outras partes do corpo extra-intestinais. São encontradas em grandes quantidades nas fezes humanas. A incidência de infecções por *Enterococcus* aumentou muito nos últimos anos devido à multiressistência das cepas e ao aumento dos pacientes imunossuprimidos (KE *et al.*, 1999). Eles persistem como agentes contaminantes em determinados ambientes, tais como os hospitais, e ainda nas mãos, roupas de cama e até nos gases fecais. Nos últimos anos, tornaram-se as principais causas de infecções nosocomiais, devido à resistência aos antibióticos. Nos EUA, é o segundo patógeno mais comum em infecções dessa natureza.

*E. faecalis* e *E. faecium* são as duas espécies responsáveis por grande parte das infecções em humanos, em especial, no trato urinário, com infecções ocasionais sendo causadas por *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. mundtii* e *E. raffinosus* (MURRAY, 1990). Cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* sobrevivem muito mais tempo na água do que outras bactérias de origem entérica. As espécies são capazes de sobreviver longos períodos em ambientes naturais, sob a exposição direta de luz solar (BALE *et al.*, 1993). A presença de enterococcus fecais na ausência de *E. coli* indica contaminação distante (DEVRIESE *et al.*, 2006). Devido a essas características, *Enterococcus*, muitas vezes, são também utilizados como indicadores de contaminação fecal.

### 3.4.5 *Staphylococcus aureus*

Os membros do gênero *Staphylococcus* são bactérias Gram-positivas que podem existir sozinhas, em pares, tétrades ou pequenas cadeias. A maioria das espécies são anaeróbias facultativas. Os membros do gênero são espalhados por vários habitats e ocupam uma variedade de nichos. *Staphylococcus aureus*, desde a sua descoberta como um patógeno

oportunista, continua ser a maior causa de mortalidade e é o responsável por uma variedade de infecções. No fim dos anos 50 e início da década de 60, *Staphylococcus aureus* causou uma considerável mortalidade como patógeno nosocomial (DWORKIN *et al.*, 2006).

Nos EUA, 30% das infecções nosocomiais são causadas por *Staphylococcus aureus*, resistentes a antibióticos (BITTON, 2005), principalmente à meticilina. Diep *et al.* (2008) relataram que um tipo mortal e resistente de *Staphylococcus aureus* conseguiu ultrapassar as fronteiras dos hospitais norte-americanos e passou a ser transmitido entre homens homossexuais.

As espécies de *Staphylococcus aureus* agem como patógenos oportunistas em águas recreacionais, provocando infecções de pele. Alguns pesquisadores recomendam que esta bactéria seja usada como um indicador adicional da qualidade sanitária dessas águas, desde que a presença da bactéria esteja associada com atividade humana em águas de recreação (CHAROENCA e FUJIOKA, 1993).

#### **3.4.6 *Campylobacter jejuni***

*Campylobacter* são bacilos Gram-negativos, microaerófilos e móveis. *Campylobacter jejuni* é a principal espécie que acomete os humanos e está relacionada à gastroenterite aguda. A fonte de infecção para humanos é principalmente o contato direto com animais portadores, o consumo de águas e alimentos de origem animal contaminados, como por exemplo, leite não pasteurizado (PINHEIRO, 2008). Ainda que sejam bastante isolados de fezes de indivíduos assintomáticos, normalmente ocasionam uma infecção autolimitada e que não necessita de tratamento. Além disso, seu isolamento requer um meio de cultura especial, o que faz com que o diagnóstico laboratorial não seja muito utilizado, acarretando um subdiagnóstico e uma subnotificação da enfermidade.

#### **3.4.7 *Clostridium perfringens***

Os clostrídios são bactérias Gram-positivas, anaeróbias, formadoras de esporos que são muito resistentes às condições ambientais adversas e mecanismos de desinfecção. *Clostridium perfringens* é encontrado no intestino e constitui-se 0,5 % da microflora fecal. *Clostridium* tem sido sugerido como indicador de vírus e protozoários em estações de tratamento de águas. São patógenos principalmente oportunistas. Tem sido verificada sua presença em ambientes

marinhos e resistem por longo tempo (mais de um ano) em sedimentos. *Clostridium perfringens* é mais associada a diarréias e também pode causar gangrena (BITTON, 2005).

### 3.4.8 *Vibrio cholerae*

*Vibrio cholerae* são bacilos Gram-negativos, levemente curvos, aeróbios, anaeróbios facultativos e fermentadores. O biótipo O:1, *El tor*, foi a forma responsável pela exacerbação da cólera na América Latina. Este é o biótipo enterotoxigênico, não invasivo, que provoca diarréia profusa e vômito com perda repentina de grandes quantidades de líquido e eletrólitos, podendo ser letal principalmente para as crianças (BASTOS *et al.*, 2003).

### 3.4.9 *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* é uma bactéria que tem se tornado muito comum em humanos, desde a sua descoberta. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a prevalência da infecção pelo *Helicobacter pylori* é maior em países em desenvolvimento e em pessoas de baixo nível sócio-econômico. A infecção por *Helicobacter pylori* é atualmente a causa mais comum da gastrite crônica e úlcera péptica, estando também associado ao câncer gástrico e a mais de 90% dos casos de linfomas associados à mucosa gástrica.

O principal modo de transmissão do microrganismo parece ser por via feco-oral, principalmente em regiões ou comunidades com condições sócio-sanitárias ou de higiene pessoal insatisfatórias. Vários estudos mostram que a transmissão da espécie *Helicobacter pylori* se dá através da água contaminada por esgotos, especialmente na irrigação de vegetais consumidos crus (LU *et al.*, 2002).

Oliveira *et al.* (1998), em seu estudo sobre prevalência de *H. pylori* em uma população residente na área rural de Araçuaí, MG, encontraram que tanto adultos quanto adolescentes e crianças apresentaram altas taxas de *H. pylori*. O estudo relatava que a população estudada vivia em casas com índice de saneamento ambiental muito baixo, condição a qual é determinante para a prevalência desse microrganismo.

Lehours e Yilmaz (2007) relataram que os fatores de risco mais comuns são o tipo de água para ingestão, a falta de utilização de instalações sanitárias na infância, os baixos salários das famílias e o baixo nível educacional. As altas prevalências de *H. pylori*, principalmente nos países em desenvolvimento, refletem a precariedade das condições de higiene pessoal e dos

serviços de saneamento como sendo fatores importantíssimos na transmissão do microrganismo.

#### **3.4.10 *Yersinia enterocolitica***

*Yersinia enterocolitica* são bacilos Gram-negativos, que não fazem parte da flora normal humana, mas têm sido isoladas, frequentemente, de fezes, feridas e escarros de seres humanos. A via de transmissão é a feco-oral, através da água e alimentos contaminados, ou por contato com pessoas ou animais infectados. A transmissão hospitalar tem sido relatada, assim como, transmissão transfusional, devido a sangue de doadores assintomáticos ou que tiveram gastroenterite leve. *Yersinia enterocolitica* acomete principalmente crianças, indivíduos debilitados ou imunodeprimidos e idosos. Essas bactérias têm sido também frequentemente isoladas em amostras ambientais, incluindo fontes de água. São patógenos que podem se multiplicar em água doce, inclusive em reservatórios de água para consumo humano, constituindo, dessa forma, um risco à saúde pública (LECLERC *et al.*, 2004).

### **3.5 *Bactérias patogênicas detectadas em esgotos domésticos***

A Tabela 3.3 apresenta uma relação das principais bactérias patogênicas detectadas em esgotos sanitários e dados quantitativos gerados nos diferentes trabalhos consultados.

**Tabela 3.3** – Bactérias patogênicas detectadas e ou quantificadas em esgotos brutos

Bactéria	Deteção/concentração	Referência
<i>Escherichia coli</i>	2,2 x 10 <sup>7</sup> UFC/100ml	Rose <i>et al.</i> (1996)
	5,2 x 10 <sup>7</sup> NMP/100mL	Chernicharo <i>et al.</i> (2001)
	2,96 x 10 <sup>4</sup> NMP/100mL (patogênica)	Lee <i>et al.</i> (2006)
	1,66 x 10 <sup>7</sup> NMP/100mL (não patogênica)	Lee <i>et al.</i> (2006)
	1,32 x 10 <sup>6</sup> NMP/100mL	Payment <i>et al.</i> (2001)
	10 <sup>6</sup> – 10 <sup>8</sup> org/100 mL	Bastos <i>et al.</i> (2003)
	2,0 x 10 <sup>7</sup> org/100 mL	Ceballos (2000)
	8,3 x 10 <sup>7</sup> UFC/100 mL	Madera (2002)
<i>Campylobacter</i>	1,93 x 10 <sup>8</sup> NMP/100 mL	Mascarenhas (2002)
	51,3 NMP/100mL	Stelzer <i>et al.</i> (1991)
	70-1630 org/100mL	Oragui <i>et al.</i> (1987)
<i>Helicobacter pylori</i>	70 org/100 mL	Ceballos (2000)
	Detectado	Lu <i>et al.</i> (2002)
<i>Helicobacter pylori</i>	Não detectado	Lee <i>et al.</i> (2006)
	<i>Salmonella spp.</i>	1,1 x 10 <sup>3</sup> NMP/100mL
2,8 x 10 <sup>3</sup> NMP/100mL		Pant e Mittal (2007)
6,04 x 10 <sup>2</sup> NMP/100mL		Lee <i>et al.</i> (2006)
> 1,1 x 10 <sup>3</sup> NMP/100mL		Koivunen <i>et al.</i> (2003)
10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup> org/100 mL		Bastos <i>et al.</i> (2003)
130 org/100 mL		Arridge <i>et al.</i> (1995)
<i>Salmonella enteritidis</i>	20 org/100 mL	Ceballos (2000)
	20 - >1800 NMP/100mL	Langeland (1982) Oragui <i>et al.</i> (1987)
<i>Shigella spp.</i>	3,7 x 10 <sup>3</sup> NMP/100mL	Pant e Mittal (2007)
<i>Shigella dysenteriae</i>	Detectado	Peng <i>et al.</i> (2002)
<i>Shigella flexneri</i>	Detectado	
<i>Shigella boydii</i>	Não detectado	
<i>Shigella sonnei</i>	Detectado	
<i>Vibrio cholerae</i> O:1 e O:130	1,0 x 10 <sup>7</sup> NMP/100mL	Curtis (1996)
<i>Vibrio cholerae</i> O:1	Detectado	Martins <i>et al.</i> (1991)
	40 org/L	Arridge <i>et al.</i> (1995)
	4,4 x 10 <sup>4</sup> NMP/100mL	Pant e Mittal (2007)
<i>Clostridium perfringens</i>	2,44 x 10 <sup>4</sup> NMP/100mL	Lee <i>et al.</i> (2006)
	1,0 x 10 <sup>5</sup> NMP/100mL	Harwood <i>et al.</i> (2005)
	5 x 10 <sup>4</sup> org/100mL	Ceballos (2000)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Não detectado	Lee <i>et al.</i> (2006)
<i>Enterococcus faecalis</i>	10 <sup>6</sup> NMP/100mL	Harwood <i>et al.</i> (2005).
	4,37x 10 <sup>3</sup> NMP/100mL	Lee <i>et al.</i> (2006)
	1,98 x 10 <sup>5</sup> NMP/100mL	Payment <i>et al.</i> (2001)
	3 x 10 <sup>6</sup> org/100mL	Ceballos (2000)
	4,7 x 10 <sup>5</sup> UFC/100 mL	Madera <i>et al.</i> (2002)
	4,1 x 10 <sup>6</sup> org/100mL	Arridge <i>et al.</i> (1995)

Fonte: Godinho *et al* (2008)

Observa-se que os valores apresentados na Tabela 3.3 foram obtidos por diferentes metodologias, seja pela utilização de NMP (número mais provável) para culturas líquidas ou UFC (unidade formadora de colônia) para contagem de colônias em placas, ou ainda por

técnicas moleculares como o FISH (*Fluorescent In-Situ Hybridisation*), que tem sido utilizado por alguns pesquisadores na quantificação de microrganismos em diversas amostras ambientais, incluindo o esgoto bruto (LEE *et al.*, 2006, OLIVEIRA e BERNARDO, 2002; BEJ *et al.*, 1991, AMANN *et al.*, 2001, REGNAULT *et al.*, 2000; GARCIA-ARMISEN e SERVAIS, 2004).

Segundo a Tabela 3.3, dentre as principais bactérias presentes nos esgotos brutos, *E. coli* é a bactéria mais frequentemente investigada. Conforme mencionado anteriormente, este fato se deve à sua utilidade como organismo indicador de contaminação fecal. De acordo com os dados apresentados na Tabela 3.3, a quantidade de *E. coli* presente em esgoto bruto encontra-se na faixa de  $10^6$  a  $10^8$  NMP/100mL (ou org/100mL).

Investigações desenvolvidas por Lee *et al.* (2006) mostraram que dentre os valores detectados de *E. coli* em esgotos brutos (na ordem de  $10^7$  NMP/100mL),  $10^4$  NMP/100mL estava relacionada a cepas patogênicas. Trata-se de um dado importante, pois ressalta que mesmo volumes menores que 100 mL podem conter cepas patogênicas na faixa de dose infectante para *E. coli* diarréiogênica que pode ser variável entre as linhagens, porém em quantidades muito baixas ( $10$  a  $10^2$  organismos – Tabela 3.2). Apesar de ser um único estudo, os resultados de Lee *et al.* (2006) mostram a necessidade do monitoramento de cepas patogênicas de *Escherichia coli*.

Espécies do gênero *Salmonella* e *Shigella* têm sido investigadas em esgotos brutos, porém em menor proporção quando comparadas a *E. coli*. De acordo com a Tabela 3.3, poucos trabalhos apresentam dados quantitativos de *Shigella* em sistemas de tratamento, a maioria se concentra na presença ou ausência do gênero nas amostras analisadas. Avaliando os diferentes trabalhos apresentados na Tabela 3.3, observa-se que a quantidade de *Salmonella* spp. encontrada em esgoto bruto situa-se na faixa de  $10^2$  a  $10^3$  NMP/100mL, sugerindo que mesmo em pequenos volumes, os valores estão inferiores à dose infectante estabelecida para salmonelose ( $10^5$  a  $10^9$  organismos).

Os enterococos têm se tornando importantes, não só por serem umas das principais causas de infecções nosocomiais, mas pelo seu expressivo papel na resistência a antibióticos. Os enterococcus sobrevivem por longos períodos no meio ambiente, ocorrendo em números elevados no esgoto sem tratamento  $10^3 - 10^6$  org/100mL e  $10^3-10^5$  no esgoto tratado - e são duas vezes mais resistentes que os coliformes termotolerantes.

Dentre os demais organismos, observa-se que a bactéria *Campylobacter jejuni* foi reportada entre 50 e 10<sup>3</sup> org/100mL. *Costridium perfringens* foi relatada na faixa de 10<sup>4</sup> a 10<sup>5</sup> NMP/100mL e *Vibrio cholerae* foi detectada em valores que variam de 40-10<sup>7</sup> NMP/100mL.

Ao comparar os dados sobre a dose infectante das bactérias patogênicas apresentados na Tabela 3.2 com os dados da Tabela 3.3, pode-se notar que a quantidade de *Salmonella* spp. encontrada em 100 mL de esgotos brutos foi aquém da dose infectante para indivíduos imunocompetentes, a qual é relatada na faixa de 10<sup>5</sup> a 10<sup>9</sup> organismos. O mesmo não se pode dizer para *Campylobacter*, *Shigella* spp. e *E. coli* enterohemorrágica, as quais foram encontradas em 100 mL de esgotos brutos, em quantidades maiores do que as doses infectantes apresentadas na Tabela 3.2, o que indica que mesmo pequenos volumes de esgoto contém organismos suficientes para causar a doença.

### **3.6 Técnicas aplicadas para investigação de bactérias patogênicas**

#### **3.6.1 Técnicas tradicionais**

Existem técnicas convencionais em microbiologia de cultivo e isolamento de microrganismos de amostras ambientais que são comumente empregadas. Como métodos tradicionais de cultivo, podemos citar algumas técnicas que são aplicadas para a investigação e enumeração de bactérias patogênicas, como a técnica NMP, mais comumente utilizada para culturas líquidas e a técnica UFC, utilizada para contagem de colônias em placas (AMPOFO e CLERK, 2003). No entanto, os protocolos para detecção de patógenos em amostras ambientais baseados no cultivo podem ser imprecisos devido à natureza seletiva do meio, uma vez que alguns requerem componentes e condições de cultura específicos (LEMARCHAND *et al.*, 2005). Além do que, estima-se que menos de 1% dos microrganismos em amostras naturais são cultiváveis (PACE *et al.*, 1986).

Portanto, há uma tendência atual em se utilizar as técnicas moleculares na avaliação de amostras ambientais devido aos recentes avanços destas técnicas nos últimos dez anos. Este fato tem transformado os estudos sobre a ecologia microbiana em um novo campo de pesquisas. Em particular, as técnicas de biologia molecular aplicada à detecção de patógenos, quando bem estabelecidas, fornecem resultados mais rápidos quando comparadas às técnicas de cultivo, pois os mesmos podem ser investigados sem a necessidade de cultivá-los.

### 3.6.2 Técnicas moleculares

Desde meados de 1980, tem sido possível o estudo da diversidade e ecologia de microrganismos em ambientes naturais por meio de técnicas de biologia molecular (HEAD *et al.*, 1998). Estas técnicas, mais independentes e mais precisas que os métodos de cultivo, objetivam analisar a estrutura da comunidade microbiana ou ainda a detecção de organismos específicos em amostras mais complexas (AMANN *et al.*, 2001), o que contribui para o aprimoramento das análises frente à necessidade de se conhecer melhor os mecanismos de remoção dos microrganismos patogênicos.

O princípio dos métodos moleculares é a aplicação de biomarcadores, moléculas que possuem regiões altamente conservadas entre os diferentes organismos e regiões variáveis, específicas de cada um, para detecção e identificação de microrganismos,. As regiões variáveis podem ser consideradas a impressão digital de um organismo (PACE *et al.*, 1986). Um biomarcador comumente utilizado para inferir identidade dos organismos é a molécula de RNA ribossomal, biomarcador denominado RNAr. O RNAr é parte integrante do ribossomo, uma estrutura celular responsável pela síntese de proteínas que está presente em todas as células e, por isso, é considerado um biomarcador ideal.

A região 16S compõe a subunidade menor dos ribossomos presentes em organismos procariontes (bactérias e arqueias). A variação genética do RNAr 16S tem sido bem explorada para inferir relações filogenéticas entre os microrganismos e para “desenhar” sondas nucleotídicas específicas para a detecção de grupos microbianos individuais em habitats naturais. Estas técnicas são aplicáveis também para se determinar a diversidade genética de comunidades microbianas e identificar os microrganismos não-cultiváveis (MUYZER *et al.*, 1993).

Por questões de manipulação laboratorial, trabalha-se mais frequentemente com o gene que codifica o RNA ribossomal, o DNAr 16S. Isto porque o DNA é uma molécula mais estável e mais fácil de manipular do que o RNA. A amplificação e análise do gene DNAr, portanto, têm sido utilizadas comumente para investigar a biodiversidade e a estrutura da comunidade microbiana de diversos ambientes, inclusive de reatores biológicos.

No entanto, há a opção de se trabalhar com outros genes além do DNAr 16S, como por exemplo genes que codificam enzimas específicas. Estes genes são fragmentos de DNA

típicos de um grupo de microrganismo, e que não devem ser encontrados nos demais. Por exemplo, o gene *nuc*, que é o gene que codifica a enzima nuclease extracelular termoestável de *Staphylococcus aureus*, é específico da mesma e está ausente nas outras bactérias (BURTSCHER e WUERTZ, 2003).

Entre as técnicas de biologia molecular que têm sido aplicadas para avaliação da presença de microrganismos em amostras ambientais, destaca-se a técnica da PCR, a qual consiste na amplificação *in vitro* do DNA e pode ser usada para identificar microrganismos em diferentes tipos de amostras sem a necessidade de cultivá-los.

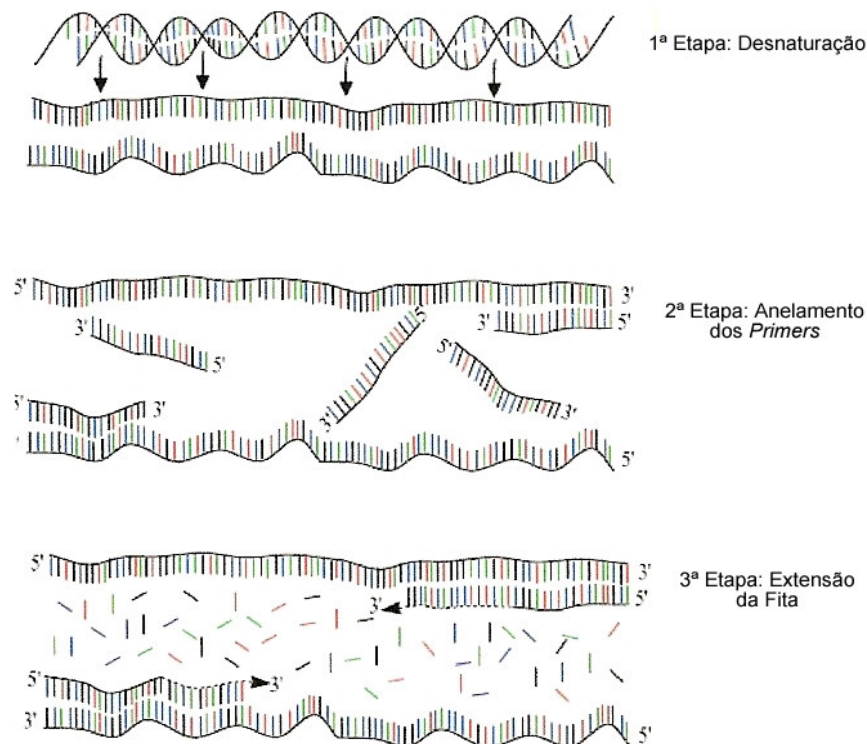
### 3.6.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A idéia básica da reação em cadeia da polimerase foi formulada por Kary Mullis em 1983 e o primeiro procedimento de uso foi publicado em 1985. A versão inicial da técnica usou a *Klenow* polimerase, enzima responsável pela cópia do DNA na PCR, para fazer cópias de um DNA *template* e dois *primers* de oligonucleotídeos, delineando a região a ser amplificada. Após cada ciclo de síntese de DNA *template*, a mistura tinha que ser aquecida a uma temperatura maior que 90° C para iniciar um novo padrão de síntese de *templates* originais. Como a *Klenow* polimerase é inativada durante o ciclo que utilizava elevadas temperaturas, foi necessário repetir a reação várias vezes com uma enzima nova, o que encareceu o procedimento e o fez ser reprovado em laboratório. A grande descoberta que levou a consolidação da técnica de PCR foi a adoção da enzima *Taq* DNA polimerase, uma enzima termoestável capaz de tolerar temperaturas elevadas por um determinado período de tempo. Isto permitiu que a reação da PCR ocorresse com múltiplos ciclos de síntese de DNA sem precisar da intervenção de um operador. Outra grande vantagem foi em relação às mudanças bruscas de temperatura, as quais passaram a ser feitas por um termociclador automático (BROWN, 1998).

A reação em cadeia da polimerase promove o aumento do número de cópias de um determinado fragmento de DNA. A região do DNA a ser amplificada é determinada pelo par de *primers* ou iniciadores, que são pequenas seqüências de DNA, construídas artificialmente, complementares e específicas a duas regiões distintas no DNA microbiano de interesse. Ou seja, são segmentos de DNA que pareiam suas bases com a fita molde funcionando como um “iniciador” para as cópias de DNA a serem formadas, uma vez que eles se hibridizam a fita

molde. Os *primers* variam desde universais a grupo-específicos, como por exemplo, os *primers* para *Escherichia coli*, L-uid739 e R-uid1578 (BEJ, 2004).

Cada ciclo de replicação *in vitro* de DNA envolve três etapas básicas: desnaturação, anelamento e extensão. Na desnaturação, normalmente a 94°C ocorre a separação da dupla-fita de DNA para exposição dos sítios-alvo. Na segunda etapa, com a diminuição da temperatura, que pode ser, por exemplo, a 55°C ocorre o anelamento dos *primers* em regiões específicas de cada fita de DNA separada, que serve como molde, delimitando, assim, a região inicial e a região final da seqüência genética a ser amplificada. Finalmente, na etapa de extensão, ocorre a síntese de DNA complementar à fita-molde e geralmente é feita em uma temperatura em torno de 72°C. Em 25 a 40 ciclos, é possível produzir em poucas horas milhões de cópias específicas de DNA, até mesmo quando a amostra de partida contém apenas uma única seqüência alvo original (WALKER *et al.*, 1999). A Figura 3.4 ilustra os três passos que constituem um ciclo na replicação do DNA.



**Figura 3.4** - Reação em cadeia da Polimerase (PCR).

Os passos descritos acima se resume na desnaturação do DNA (separação da dupla-fita), anelamento dos *primers* e por último, extensão dos *primers* ou amplificação. Após

aproximadamente 30 ciclos com duração em média de 3 horas, o fragmento de DNA é amplificado e acumulado exponencialmente. A técnica de PCR pode ser desenvolvida em um aparelho próprio denominado termociclador, no qual o controle de temperatura para as etapas de desnaturação e anelamento é feito de forma automática. São componentes da PCR, a *Taq* DNA polimerase, os *primers*, nucleotídeos, o DNA *template*, entre outros reagentes.

Devido à rapidez, especificidade e baixo custo, a PCR tem se tornado uma das técnicas mais usadas para a detecção de microrganismos patogênicos em amostras ambientais. No entanto, algumas vezes, a PCR pode apresentar alguns problemas, como a inibição da amplificação do fragmento de DNA de interesse ou a amplificação de fragmentos incorretos, entre outros. Diante disso, há guias disponíveis na literatura com o intuito de esclarecer sobre as possíveis causas de tais erros e com as medidas a serem tomadas para que estes sejam remediados (BROWN, 1998). Existe ainda um limite de detecção do método da PCR. Limite o qual nos permite inferir que um microrganismo, às vezes, não está ausente na amostra analisada e sim, abaixo do limite de detecção do método.

Dessa forma, seria oportuno conhecer este limite. No entanto, existem fatores que afetam o limite de detecção da PCR e conseqüentemente, a interpretação e a comparação de resultados da PCR até mesmo entre laboratórios, como por exemplo, a concentração de  $MgCl_2$ , fornecedor e concentração da *Taq* DNA polimerase, temperatura de anelamento dos *primers*, variação no lote de iniciadores, métodos de extração de DNA, modelo do termociclador e tipo de amostra (TYLER *et al.*, 1997).

O trabalho de Burtscher e Wuertz (2003), o qual avalia o uso da PCR para a detecção de bactérias patogênicas em lodos, mostra que o limite de detecção para a bactéria *Staphylococcus aureus* é de  $10^6$  UFC/g de amostra de lodo e para *Salmonella* spp., o limite é de  $10^7$  UFC/g de amostra de lodo. Para as espécies *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica*, o limite de detecção do método é o mesmo, na ordem de  $10^7$  UFC/g de amostra de lodo.

Santos *et al.* (2001), ao estudar a identificação de *Salmonella* através da PCR, revelou um limite de detecção de 10 UFC/mL para *Salmonella enteritidis* em culturas puras. Tamanai-Shacoori *et al.* (1994) obtiveram um limite de detecção para *Escherichia coli* enterotoxigênica de 1 UFC/mL em amostras de água não tratada, utilizando a filtração como método de purificação e concentração da amostra bruta.

Embora a reação de PCR seja capaz de amplificar a seqüência de DNA alvo a partir de um único microrganismo, um volume extremamente pequeno (1µL) de amostra de DNA utilizado na reação, restringe o limite de detecção da PCR em, aproximadamente,  $10^2$  ou  $10^3$  células/mL, apesar da alta sensibilidade do PCR. Por isso, em alguns casos, etapas de enriquecimento são geralmente necessárias para aumentar o número de células a um nível detectável (SHARMA e CARLSON, 2000).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Área de estudo e características do sistema UASB-LP

O aparato experimental utilizado para a realização deste trabalho foi composto de um reator UASB, três lagoas de polimento e um filtro de pedra, brita 3, inserido na metade final da lagoa 3. O aparato faz parte do Centro de Pesquisas e Treinamento em Saneamento – CePTS/UFMG/COPASA, localizado na ETE Arrudas, em Belo Horizonte, Minas Gerais. O sistema como se apresenta atualmente está representado na Figura 4.1.



**Figura 4.1** - Vista do sistema reator UASB – Lagoas de polimento (1, 2, 3) e filtro de pedra.

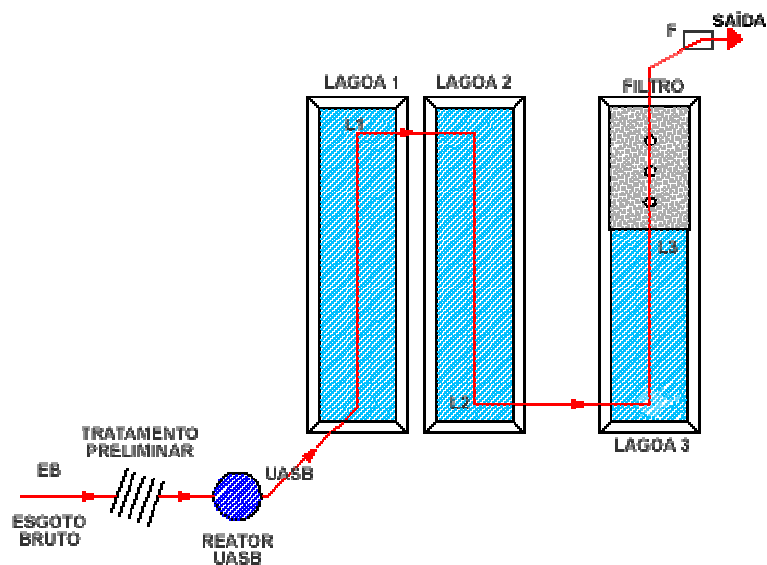
As Tabelas 4.1 e 4.2 apresentam as características das unidades do aparato experimental e a Figura 4.2 ilustra um desenho esquemático do sistema UASB-Lagoas de Polimento com os respectivos pontos de coletas das amostras.

**Tabela 4.1** - Características do reator UASB e das lagoas de polimento

Reator UASB	Lagoas de Polimento 1 e 2	Lagoa de Polimento 3
Volume: 14,2 m <sup>3</sup>	Volume: 125 m <sup>3</sup>	Volume: 42 m <sup>3</sup>
Altura: 4,5 m	Comprimento no fundo: 25,00 m	Comprimento no fundo: 16,56 m
Diâmetro: 2,0 m	Largura no fundo: 5,25 m	Largura no fundo: 5,25 m
TDH: 11,8 h	Profundidades médias: 0,69 m e 0,62m	Profundidade média: 0,48 m
Vazão Média: 29 m <sup>3</sup> /d	TDH em cada lagoa: 4,3 d	TDH: 1,5 d

**Tabela 4.2 - Característica do Filtro de pedra (brita 3)**

Comprimento do fundo: 8,44 m	Altura da lâmina d'água: 0,50 m
Largura a 0,40 m de altura: 6,05 m	Altura do filtro: 0,70 m
Comprimento a 0,40 m de altura: 8,44 m	Inclinação dos taludes: 45°
Largura no fundo: 5,25 m	TAH: 1,6 m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> /dia



**Figura 4.2 - Esquema Geral do Sistema UASB-Lagoas de polimento e Filtro, com os respectivos pontos de coleta das amostras (EB, UASB, L1, L2, L3 e F).**

## 4.2 Amostragem

Foi realizada uma amostragem da lagoa 3 no dia 17/04/07 para realização de testes para avaliação dos métodos de preparação de amostras de lagoas de polimento. As coletas para o estudo da investigação dos patógenos foram feitas apenas em duas campanhas, uma em 25/04/2007 e outra em 27/02/2008. Outras coletas haviam sido programadas, porém não foi possível realizá-las devido ao longo tempo para o estabelecimento das técnicas propostas.

Os pontos de coleta foram: esgoto bruto (EB), efluente do UASB (UASB), efluente das lagoas 1, 2 e 3 (L1, L2, L3) respectivamente e efluente do filtro de pedra (F). A descrição dos pontos, assim como o tipo de amostragem, estão na Tabela 4.3. Foi coletado um volume de 2 L de amostra para cada ponto. As amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do DESA (Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental) e preparadas para armazenamento no mesmo dia. As características físico-químicas das amostras do

sistema UASB-LP nos dias das duas coletas estão apresentadas nas Tabelas 9.1 e 9.2 do Anexo 1.

**Tabela 4.3** - Descrição dos pontos de amostragem

<b>Ponto de coleta</b>	<b>Descrição do ponto</b>	<b>Tipo de amostragem</b>
EB	Esgoto Bruto	Composta
UASB	Efluente do reator UASB	Composta
L1	Efluente da Lagoa 1	Composta (ao longo de toda a profundidade)
L2	Efluente da Lagoa 2	Composta (ao longo de toda a profundidade)
L3	Efluente da Lagoa 3	Composta (ao longo de toda a profundidade)
F	Efluente do Filtro de pedra	Pontual

### **4.3 Métodos de preparação de amostras**

As amostras de esgoto bruto e do efluente do UASB foram centrifugadas a 4.000 rpm por 15 minutos e, após a centrifugação, o material retido no fundo do frasco foi ressuspendido em Tampão de extração (descrito no item 4.4) obtendo-se um volume final de 12 mL (LEMARCHAND *et al.*, 2005).

Para os efluentes das lagoas, quatro diferentes estratégias de concentração da amostra foram testadas utilizando a lagoa 3 como referência (Tabela 4.4). O objetivo deste teste foi obter um procedimento adequado para remoção de algas e concentração da amostra, pois acreditava-se que a predominância de algas nas amostras poderia comprometer as análises moleculares posteriores, uma vez que após a extração de DNA genômico (método mecânico, descrito a seguir) grande quantidade de DNA algal estaria presente no extrato com DNA bacteriano

O procedimento 1 (P1) envolveu a centrifugação de 2L do efluente, tal como realizado para as amostras de esgoto bruto e efluente do UASB. Os procedimentos 2, 3 e 4 envolveram etapas de filtração para remoção do excesso de algas. A avaliação de cada procedimento foi realizada através da qualidade das extrações de DNA pelo método descrito nos item 4.4. O procedimento cujos resultados fossem os mais satisfatórios, através de uma análise visual do DNA extraído no gel de agarose, seria utilizado para concentração das amostras coletadas nas campanhas dos dias 25/04/2007 e 27/02/2008. Todas as amostras concentradas foram armazenadas em tubos tipo *Eppendorf* de 2,0 mL e mantidos a -20°C para posterior análise molecular.

**Tabela 4.4** - Procedimentos testados para preparação de amostra do efluente das lagoas de polimento

Procedimento	Método	Amostra gerada	Referência
P1	Centrifugação a 4.000 rpm por 15 minutos de 2 Litros da amostra da lagoa sem filtração prévia.	12 mL em tampão de extração A	Lemarchand <i>et al.</i> (2005)
P2	Pré-filtração de 2 Litros de amostra da lagoa em filtro de 8,0 µm de porosidade, por duas vezes, seguido de filtração da amostra obtida em membrana éster de celulose de 1,2 µm de porosidade, seguida de centrifugação a 4.000 rpm por 20 minutos.	12 mL em tampão de extração A	Gich <i>et al.</i> (2005)
P3	Filtração do efluente obtido do procedimento 2 em membrana de fibra de vidro e membrana de éster celulose, ambas de 0,45 µm de porosidade.	Biomassa retida na membrana	Gich <i>et al.</i> (2005)
P4	Re-filtração do filtrado obtido no procedimento 3 em membrana éster de celulose de 0,22 µm de porosidade.	Biomassa retida na membrana	Gich <i>et al.</i> (2005)

#### 4.4 Extração de DNA genômico

Foram avaliados dois métodos de extração de DNA, o método 1 descrito por Yu e Mohn (1999) e modificado por Lemarchand *et al.* (2005) e o método 2 descrito por Egli *et al.* (2003).

Os itens a seguir elucidam todas as etapas do protocolo de extração denominado método 1:

1. centrifugar 1 mL da amostra a 16.000 x g por 10 minutos e desprezar o sobrenadante;
2. adicionar 2,0 g de pérola de vidro (tamanho 1 mm) e 1 mL do tampão de extração A [50 mM Tris-HCL pH 8,0, 0,5 mM EDTA, 3% de SDS];
3. levar ao microdesmembrador à 4.800 rpm por 2,5 minutos duas vezes, mantendo os frascos em banho de gelo por 1 minuto entre as agitações;
4. centrifugar a 16.000 x g por 3 minutos e coletar o sobrenadante;
5. ressuspender o material sedimentado em 1 mL do tampão de extração, repetir a etapa 3 e misturar os sobrenadantes;

6. adicionar 1 volume de acetato de amônia (concentração final 2 M) e levar ao banho de gelo por 5 minutos;
7. centrifugar à 16.000 x g por 5 minutos e coletar o sobrenadante;
8. repetir as etapas 6 e 7 para eliminar impurezas residuais;
9. adicionar 1 volume de isopropanol e manter a -20°C por 50 minutos ou “overnight”;
10. centrifugar a 16.000 x g por 15 minutos;
11. lavar o *pellet* com etanol 70%, centrifugar por mais 5 minutos e secar ao ar;
12. dissolver o DNA em 400 µL de tampão TE 1x (Tris [1 M] 10 mM; EDTA [0,5 M], 1 mM) e precipitar em 2,5 volumes de etanol 100%;
13. centrifugar por 15 minutos a 16.000 x g e lavar o *pellet* com 1 mL de etanol 70%;
14. centrifugar por 15 minutos e, finalmente, ressuspender cada *pellet* em 50 µL de TE 1x.

Alterações no protocolo descrito acima foram testadas a fim de simplificá-lo e adequá-lo aos efluentes a serem testados, principalmente o da lagoa de polimento. As modificações foram basicamente a diminuição do volume da peróla de vidro (1,5 g), agitação no vórtex após a adição do acetato de amônia e a principal delas foi a redução das lavagens do extrato de DNA. Portanto, as etapas 12, 13 e parte da 14 foram removidas, restando somente ressuspender o material obtido em 50 µL de TE 1x.

Outra modificação também importante foi com relação à etapa inicial do protocolo. Como dito anteriormente, o *pellet* gerado nos procedimentos 1, 2 e 5 foi ressuspendido no tampão de extração, e assim, não houve a necessidade de acrescentá-lo novamente. Dessa forma, 1 mL de amostra (já com tampão de extração) foi acrescida diretamente a 1,5 g de pérola de vidro.

O método 2, descrito por Egli *et al.* (2003), consistiu das seguintes etapas:

1. centrifugar 2 mL da amostra a 16.000 x g por 5 minutos;
2. desprezar o sobrenadante;

3. adicionar ao *pellet* 900 µL de tampão TEN (0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA, pH 8,0) e transferir para um tubo de rosca com 0,2 g de pérola de vidro (tamanho 1 mm);
4. levar ao microdesmembrador à velocidade máxima de 4.800 rpm por 1 minuto;
5. resfriar em gelo por 1 minuto e repetir a agitação no microdesmembrador para evitar a perda de DNA;
6. deixar o frasco em repouso por mais ou menos 5 minutos para coletar o sobrenadante;
7. misturar a amostra com 1:1 Tris-fenol (pH 8,0); agitar para homogeneizar e acrescentar 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 vol/vol);
8. agitar e centrifugar a 13.000 x g por 10 minutos a 4° C; transferir a fase aquosa para novo tubo *Eppendorf* e repetir a etapa do clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 vol/vol);
9. agitar e centrifugar novamente a 13.000 x g por 10 minutos a 4°C e repetir essa etapa enquanto a amostra apresentar contaminantes;
10. precipitar o DNA com 2 volumes de etanol e 0,1 volume de acetato de sódio 3M (pH 5,5) por 24h à - 20° C;
11. centrifugar a 13.000 x g por 10 minutos; lavar o *pellet* com 200 µL de uma solução de etanol 70% (vol/vol) e 30% TE 1x e centrifugar a 13.000 x g por 3 minutos;
12. retirar o sobrenadante e deixar o *pellet* secar ao ar;
13. ressuspender o *pellet* em 40 µL de água estéril quente (70° C) e armazenar a -20°C.

Para garantir a representatividade das amostras e quantidade de ácidos nucléicos, as extrações para ambos os métodos foram realizadas em triplicatas. Os volumes gerados das triplicatas foram posteriormente misturados e novamente purificados em 0,1V de Acetato de Sódio 3M e 2,5V de Etanol Absoluto.

Alíquotas de 5,0 µL de cada amostra extraída foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,0% a 75 V por 40 minutos. O gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta para verificação da extração do DNA genômico.

#### 4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As extrações obtidas para as amostras analisadas foram submetidas à amplificação por PCR, utilizando diferentes iniciadores (*primers*). As concentrações e volumes das reações de PCR estão apresentados na Tabela 4.5. As reações ocorreram na presença de tampão da reação (*Phoneutria*), primers (*Bioneer*), dNTP (*Fermentas*), BSA (albumina de soro bovino; *Sigma*), enzima *Taq* polimerase (*Phoneutria*) e amostra de DNA extraído (diluído ou não).

**Tabela 4.5** - Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de PCR

Reagentes	Concentração estoque	Concentração por reação	Volume (µL)
Água ultra-pura	-	-	16,875
Tampão*	10X	1X	2,5
dNTP	10 mM Total	200 µM Total	0,5
Primer 1	10 pmol/µL	200 nM	0,75
Primer 2	10 pmol/µL	200 nM	0,75
BSA	2,5 mg/mL	600 ng	3,0
Taq Polimerase	5 u/µL	1,25 u	0,125
DNA <i>template</i>			0,5**
Volume total			25 µL

\* Tampão acrescido de 50mM de MgCl<sub>2</sub> (concentração por reação 1,5 mM)

\*\*Concentração não conhecida

A análise de patógenos foi realizada com a utilização de *primers* específicos para cada grupo alvo, conforme apresentado na Tabela 4.6. Foi montado um Programa Geral com uma temperatura de anelamento específica, a qual foi determinada por meio de reações de PCR com culturas puras das bactérias investigadas. As condições de amplificação do DNA extraído das bactérias patogênicas na técnica do PCR, consistiram das seguintes etapas:

- 3 minutos a 94°C (desnaturação inicial);
- 30 ciclos de 60 segundos a 94° C (desnaturação);
- 1 minuto a T° de anelamento específica;
- 1 minuto a 72°C (extensão);
- 7 minutos a 72° C (extensão final).
- As temperaturas de espera inicial e final foram de 94°C e 4°C, respectivamente.

**Tabela 4.6** - Lista dos *primers* específicos utilizados para detecção de bactérias patogênicas por PCR

Bactéria	Nome dos primers	Seqüência de nucleotídeos 5' → 3'	Gene alvo	Amplicon (pb)	Temperatura de anelamento Recomendada (°C)	Fonte
<i>E. coli</i> Total	L-uid739	tgtaattaccgacgaaaacggc	<i>uidA</i>	840 pares de base	65	Bej (2004) e Bej <i>et al.</i> (1991)
	R-uid578	gtggcgaaatattcccgtgcact				
<i>Salmonella typhimurium</i>	L-himA	cgtgctctggaaaacggtgag	<i>himA</i>	123 pares de base	65	Bej (2004) e Bej <i>et al.</i> (1994)
	R-himA	cgtgctgtaataggaatatctca				
<i>Shigella dysenteriae</i>	L-phoBR	attgaagccgcgccgacgcaa	<i>phoB-phoR</i>	152 pares de base	68	Bej (2004)
	R-phoBR	cgttgccctgacacctgaggg				
<i>Enterococcus</i> spp.	Ent1	tactgacaaaccattcatgatg	<i>tuf</i> gene	112 pares de base	55	Ke <i>et al.</i> (1999)
	Ent2	aactcgtcaccaacgcgaac				
<i>H. pylori</i>	HP1	gcaatcagcgtcagtaatgttc	16S rDNA	521 pares de base	55	Lu <i>et al.</i> (2002)
	HP2	gctaagagatcagcctatgtcc				
<i>Shigella</i> spp.	Shi-1	cttgaccgcctttccgatac	<i>ipah</i> gene	610 pares de base	50	Wang <i>et al.</i> (1997)
	Shi-2	cagccaccctctgagagta				
<i>Salmonella</i> spp.	Sal-3	tatcgccacgttcgggcaa	<i>invA</i> gene	275 pares de base	50	Wang <i>et al.</i> (1997)
	Sal-4	tcgcaccgtcaaaggaacc				
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	L-vt2a	ttaaccacacccacggcagt	vt	346 pares de base	55	Bej <i>et al.</i> (2004) e Pollard <i>et al.</i> (1990)
	Lvt2b	gctctggatgcatctctggt				
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Y.16S-86f	gcggcagcgggaagtagttta	16S rDNA	416 pares de base	53	Burtscher e Wuertz (2003)
	Y.e.eur.16S-455r	caatcacaaggttattaacctttatg				
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>nuc1</i>	gcgattgatggtgatacggtt	nuc	270 pares de base	55	Burtscher e Wuertz (2003)
	<i>nuc2</i>	agccaagccttgacgaactaaagc				

Apesar das temperaturas de anelamento dos *primers* terem sido informadas nos artigos de origem (Tabela 4.6), optou-se por determinar as melhores temperaturas de anelamento para cada *set* de *primers* nas condições de amplificação descritas acima. Utilizou-se DNA extraído de culturas puras em um PCR gradiente (*Mastercycler Gradient, Eppendorf*) onde são testadas simultaneamente várias temperaturas diferentes.

As culturas puras utilizadas neste estudo estão apresentadas na tabela 4.7, assim como o gradiente de temperatura testado e a fonte destas culturas puras.

**Tabela 4.7** - Culturas puras de bactérias, gradiente de temperatura e fonte das culturas

Bactéria	Grupo alvo	Gradiente de Temperatura (°C)	Fonte das culturas
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	L-uid73 R-uid578	49,2 a 62,0	Laboratório Micra
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Ent1 Ent2	49,2 a 62,0	Laboratório Micra
<i>Helicobacter pylori</i>	HP1 HP2	51,5 a 59,5	Hospital das Clínicas (UFMG)
<i>Salmonella sp.</i>	L-himA R-himA	51,5 a 59,5	Fundação Ezequiel Dias (FUNED)
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 23175	Shi-1 Shi-2	51,5 a 62,0	Fundação André Tosello*
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	nuc1 nuc2	51,5 a 59,5	Laboratório Micra
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 23175	L-phoBr R-phoBr	51,5 a 62,0	Fundação André Tosello
<i>Salmonella sp.</i>	Sal-3 Sal-4	51,5 a 59,5	Fundação Ezequiel Dias (FUNED)
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 25931	Y.e.eur.16S-86f Y.e.eur.16S-455r	49,2 a 62	Fundação André Tosello

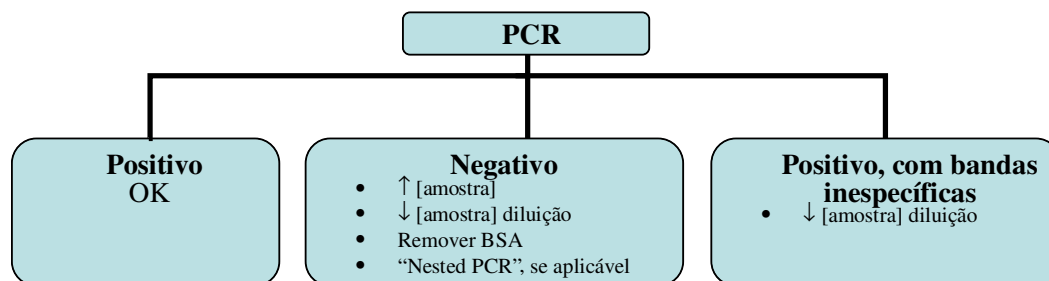
\*Coleção de Culturas Tropicais Fundação André Tosello, Campinas, SP.

Após a obtenção das melhores temperaturas de anelamento, as reações de PCR para as amostras foram realizadas no mesmo termociclador.

Devido à diferença nas características das amostras analisadas, uma estratégia de PCR foi elaborada a fim de garantir os resultados de amplificação (Figura 4.3). O fluxograma pode ser interpretado da seguinte maneira: se o resultado da PCR for positivo, alcançou-se um resultado satisfatório. Se for positivo, porém com bandas inespecíficas, o próximo passo foi o de diminuir a quantidade de amostra, através de diluições. A terceira opção é quando o resultado da PCR for negativo. Dessa forma, algumas atitudes foram tomadas. A primeira delas foi aumentar a quantidade de amostra. Se o resultado permanecer negativo, diminui-se a

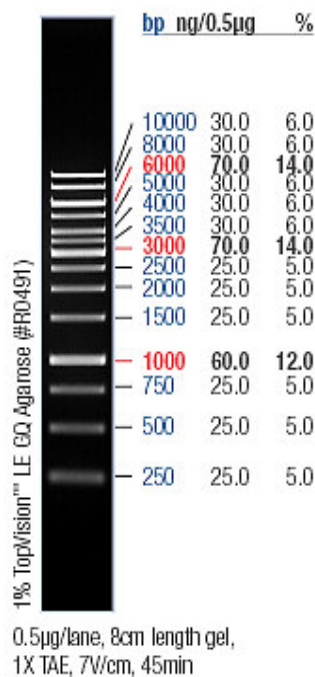
quantidade de amostra, através de diluições. A terceira opção seria fazer a PCR sem o reagente BSA e por último, permanecendo negativo o resultado, a técnica do “Nested PCR” (amplicon obtido a partir de duas ampliações sucessivas) seria a última opção, quando aplicável.

Uma vez estabelecidas as melhores condições de amplificação para cada amostra e para cada set de primers, as reações de PCR foram repetidas no mínimo, três vezes, para garantir a confirmação do resultado.

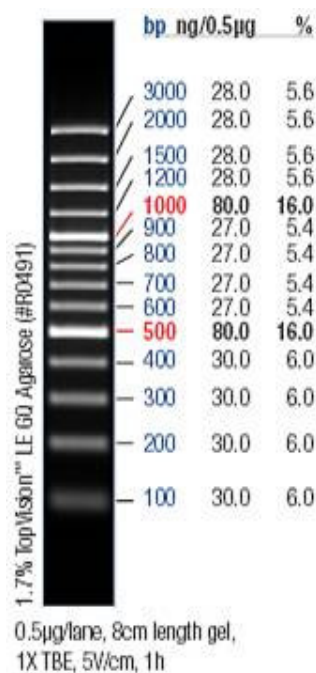


**Figura 4.3** - Fluxograma da estratégia de PCR.

Os produtos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose entre 1 e 2% (a depender do tamanho do fragmento) para verificação dos resultados. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e observados em um transiluminador de luz UV. As imagens dos géis foram registradas por um sistema de captura de imagem. Os ladders utilizados foram o *GeneRuler* 1Kb e o *O’GeneRuler* 100 bp, ambos da *Fermentas*. As Figuras 4.4 e 4.5 ilustram respectivamente os padrões dos ladders *GeneRuler* 1Kb e o *O’GeneRuler* 100 bp.



**Figura 4.4** – Padrão do *ladder* GeneRuler 1Kb.



**Figura 4.5** – Padrão do *ladder* O'GeneRuler 100 bp.

#### 4.6 Cultivo e manutenção das culturas bacterianas

O cultivo das bactérias descritas na Tabela 4.7 foi feito em ágar nutriente, composto por 3,0 g de extrato de carne, 5,0 g de peptona, 15,0 g de ágar e 1000 mL de água destilada. Os ingredientes foram dissolvidos na água destilada, não filtrados e autoclavados por 15 minutos a 121°C. Após esta etapa, os mesmos foram dispensados em placas estéreis. As bactérias foram repicadas neste meio, os quais foram mantidos por 48 horas a 37°C para crescimento. Foi utilizado o método de Egli *et al.* (2003), descrito no item 4.4, para extração do DNA das culturas bacterianas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação dos procedimentos de preparação e concentração das amostras

A escolha do procedimento para preparo e concentração das amostras dos efluentes das lagoas foi de fundamental importância, pois garantiu uma quantidade suficiente e representativa de biomassa bacteriana, da qual foram investigados os patógenos presentes. Para isso foram testados 4 procedimentos, descritos detalhadamente na Tabela 4.4. A avaliação dos procedimentos ocorreu por meio da análise visual em gel de agarose da qualidade e quantidade de DNA genômico extraído pelo método adaptado de Lemarchand *et al.* (2005) (método 1).

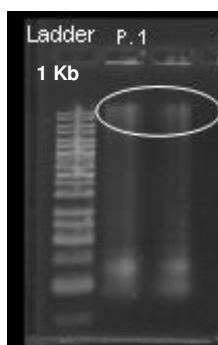
Para o procedimento 1, o volume obtido após centrifugação por 15 minutos sem filtração foi bastante concentrado, uma vez que o efluente não passou por remoção prévia das algas. A extração do DNA das amostras foi positiva (Figura 5.1), ressaltando porém, que o DNA genômico obtido pode ser tanto das bactérias quanto das microalgas presentes nas lagoas.

Já no procedimento 2, as algas foram removidas pelo pré-filtro. Porém, devido à elevada concentração de algas nas lagoas de polimento, foi necessário utilizar de 2 a 3 pré-filtros para cada filtração, dependendo da turbidez da amostra. De acordo com o resultado da extração de DNA da amostra submetida a este procedimento (Figura 5.1), assumiu-se que trata-se de DNA predominantemente bacteriano, já que grande parte das algas foi removida.

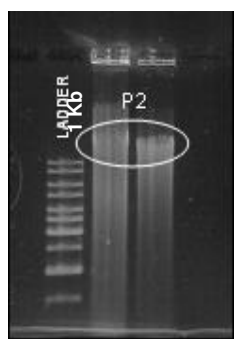
Gich *et al.* (2005), ao avaliar a comunidade bacteriológica de lagos com diferentes níveis de poluição, submeteram as amostras aquáticas à filtração como uma alternativa para remoção de algas, pois acreditava que a predominância das mesmas poderia comprometer as futuras análises moleculares. Falco (2005), ao avaliar a presença de bactérias em lagoas de estabilização por técnicas moleculares, também utilizou o procedimento de remoção das algas por filtração para não comprometer a análise de suas amostras.

O procedimento 3 aplicou uma filtração do efluente obtido do procedimento 2 em membranas de fibra de vidro de 0,45  $\mu\text{m}$  para avaliação da biomassa bacteriana. Um total de 4 filtros com biomassa retida foram cortados em tira, colocados em tubo Falcon e fervidos durante 20 minutos com objetivo de desprender a biomassa do material suporte (GICH *et al.*, 2005).

Porém, este procedimento levou a uma “dissolução” da membrana, tornando o meio altamente concentrado com material constituinte do filtro. Esta amostra quando submetida ao método de extração de DNA apresentou resultado negativo (Figura 5.2). A ausência de DNA pode ter sido por causa da pouca biomassa retida, talvez as bactérias tenham passado pelo filtro, ou por causa da degradação do DNA durante o processo de extração.



**Figura 5.1** - Gel confirmativo de extração do DNA das amostras obtidas dos procedimentos 1 e 2 .



**Figura 5.2** - Gel confirmativo de extração do DNA das amostras obtidas dos procedimentos 3 e 4 .

Ainda quando a opção para a membrana de fibra de vidro seja raspar o material retido ao invés de fervê-lo, verificou-se a impossibilidade de que o sedimento obtido ficasse completamente livre de “pedaços” da membrana. Quando a membrana utilizada foi a éster de celulose, esta colmatou-se rapidamente, não sendo possível filtrar mais que 50 mL de amostra. Verificou-se que a colmatação da membrana éster de celulose, porosidade 0,45  $\mu\text{m}$ , parece ser devido a outros materiais finamente particulados e não precisamente às algas em si, o que impede que a filtração seja eficiente. Esta amostra quando submetida ao método de extração de DNA apresentou também resultado negativo (resultado não mostrado).

No procedimento 4, utilizando-se membrana tipo éster de celulose e porosidade 0,22  $\mu\text{m}$  para retenção da biomassa que eventualmente passou pelo filtro 0,45  $\mu\text{m}$ , a amostra obtida foi extremamente reduzida, já que a porosidade é ainda menor que a anterior e a membrana colmatou-se ainda mais rápido, sendo possível a filtração de um volume de apenas 7 mL. Isto torna o procedimento inviável, principalmente se for necessário trabalhar com volumes de amostras a partir de 1 Litro (considerado mínimo quando se deseja avaliar bactérias em efluentes de lagoas de polimento), o que demandaria bastante tempo para se realizar a tarefa, além de ser necessário utilizar muitas membranas, o que poderia onerar o procedimento.

As amostras obtidas dos procedimentos 3 e 4, quando submetidas ao protocolo de extração de ácidos nucleicos (método 1), não geraram DNA, já que o procedimento de concentração impossibilitou a coleta de um volume de biomassa suficiente, a fim de que o DNA pudesse ser extraído (Figura 5.2). Isso porque ambas as membranas de éster celulose colmataram-se rapidamente. Esta colmatção foi provocada, como disse anteriormente, por outros materiais finamente particulados e não precisamente às algas em si, o que impediu que a filtração fosse eficiente. Não houve também extração de DNA quando se utilizou a amostra retida na membrana de fibra de vidro fervida, pois esta se dissolveu quando aquecida.

Dentre os dois procedimentos que resultaram em DNA, optou-se pelo uso do procedimento 2 para preparo de amostras, pela garantia de predominância de DNA bacteriano. Este último ponto foi considerado na escolha, pois temia-se que a presença de grandes quantidades de DNA algal pudesse comprometer as análises moleculares posteriores, tanto pela competição pelos reagentes quanto na diminuição na quantidade de DNA *template* nas reações de PCR.

## **5.2 Extração de DNA Genômico**

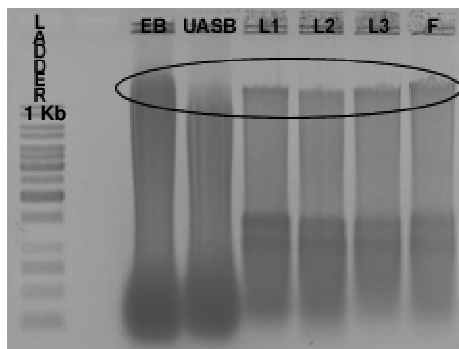
### **5.2.1 Avaliação dos protocolos de extração de DNA**

A avaliação dos protocolos de extração foi feita para as amostras coletadas na primeira campanha, previamente concentradas pelo procedimento 2. A comparação dos resultados foi feita empiricamente através da visualização das bandas nos géis de agarose, devido à indisponibilidade de métodos para quantificação do DNA extraído.

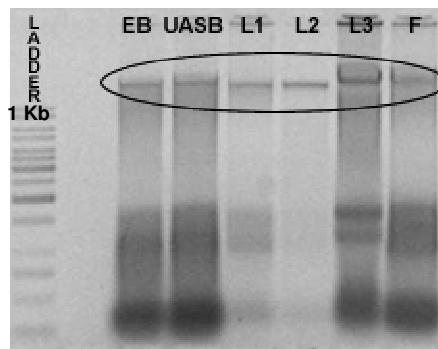
Comparando os resultados das extrações do método 1 (Figura 5.3) e método 2 (Figura 5.4), observa-se que a intensidade do sinal das bandas obtidas pelo método 2 foram mais nítidas e intensas, indicando que mais DNA foi extraído pelo método 2. Além disso, o método 2 gerou menos contaminantes no material extraído, a saber pela ausência de “rastros” nos géis. Desta forma, quanto à extração de DNA das amostras de todos os pontos da primeira campanha, o método de Egli *et al.* (2003) (método 2) mostrou-se mais eficiente que o método adaptado de Lemarchand *et al.* (2005) (método 1).

Além da melhora na quantidade de DNA extraído, o método de Egli *et al.* (2003) é mais rápido e prático do que o método 1, o que facilitou o trabalho laboratorial. Desta forma,

utilizou-se o método 2 para as extrações das amostras coletadas na campanha 2 e para as culturas bacterianas puras.



**Figura 5.3** - Imagem negativa do gel confirmativo de extração do DNA pelo método adaptado de Lemarchand *et al.* (2005) (método 1).

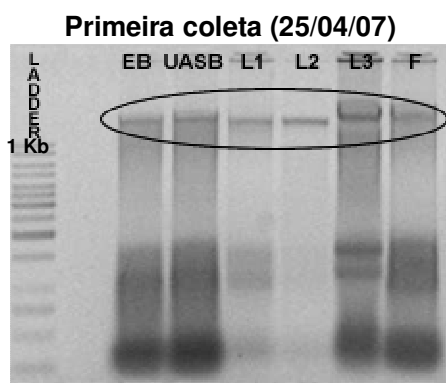


**Figura 5.4** - Imagem negativa do gel confirmativo de extração do DNA pelo método de Egli *et al.* (2003) (método 2).

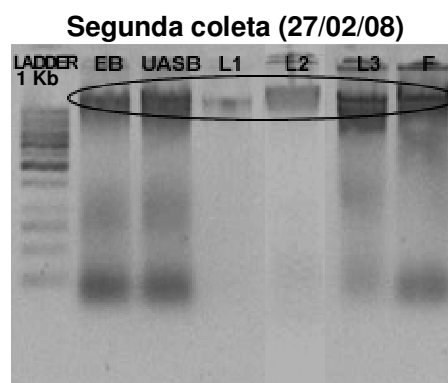
### 5.2.2 Extração de DNA das amostras do sistema UASB-LP e das culturas puras

As amostras de esgoto bruto e dos efluentes do reator UASB, das lagoas e do filtro coletadas em duas campanhas foram submetidas ao procedimento 2 de concentração e ao protocolo de Egli *et al.* (2003) para extração do DNA genômico. Os resultados das extrações das amostras coletadas na campanha 1 estão mostrados nas Figuras 5.5, enquanto que as extrações de DNA das amostras da campanha 2 estão mostradas na Figura 5.6. As regiões dos géis marcados pela elipse se referem ao DNA extraído das amostras.

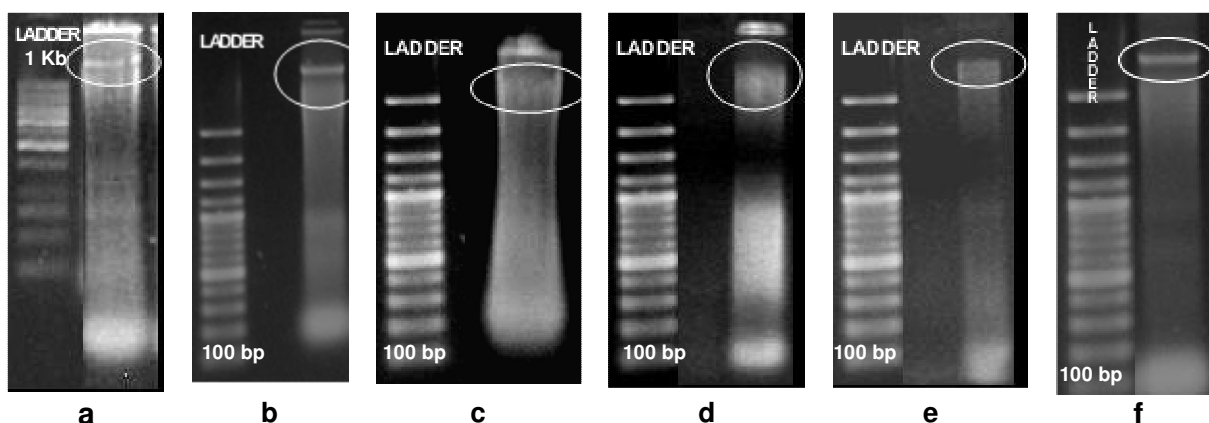
O método de Egli *et al.* (2003) foi usado também para realização das extrações de DNA das culturas puras a serem utilizadas como controles no PCR. Inicialmente as culturas foram cultivadas em meio ágar nutriente e após 2 dias de incubação, 0,5 g de células foram transferidas para um tubo de 2 mL e submetidas ao protocolo de extração de DNA. A Figura 5.7 apresenta os resultados das extrações de cada cultura pura testada.



**Figura 5.5** - Imagem negativa do gel confirmativo de extração do DNA para as amostras do esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro.



**Figura 5.6** – Gel confirmativo da extração de DNA para as amostras do esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro.



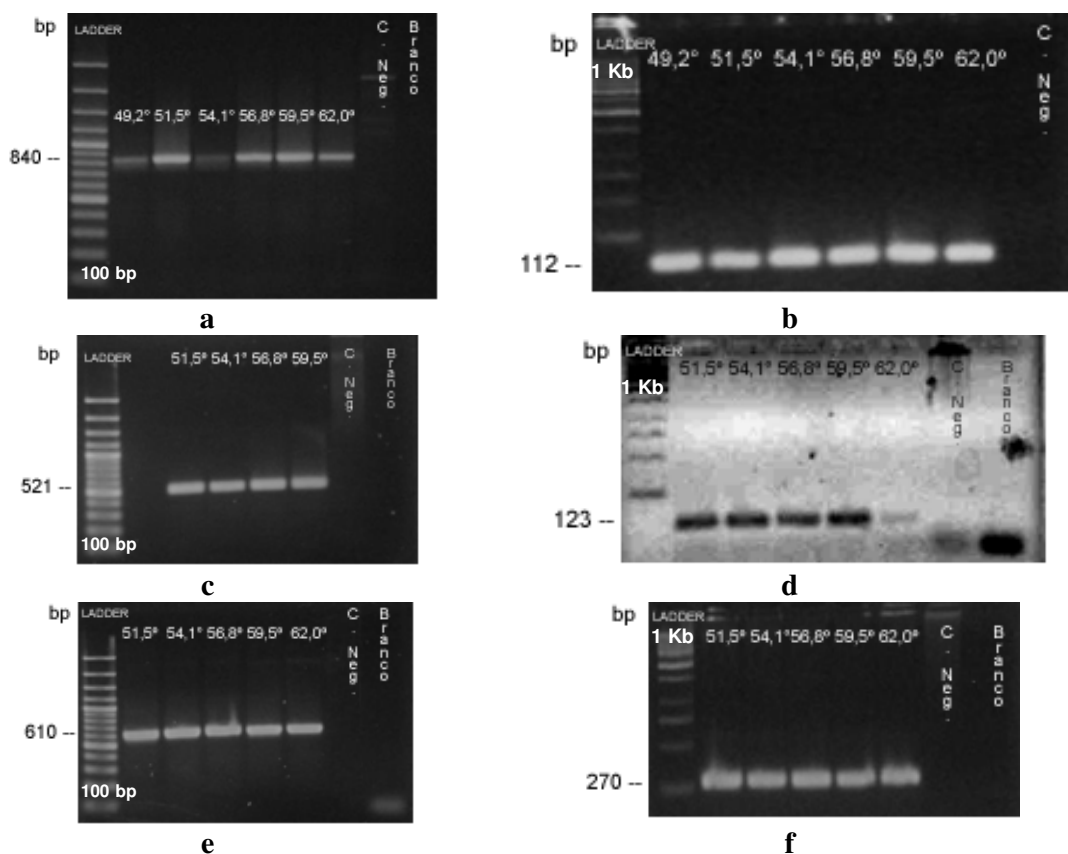
**Figura 5.7** - Gel confirmativo de extração do DNA para as amostras de cultura pura: a) *Escherichia coli* b) *Shigella sonnei* c) *Staphylococcus aureus* d) *Enterococcus faecalis* e) *Salmonella* spp. e f) *Yersinia enterocolitica*.

### 5.3 Amplificações por PCR

#### 5.3.1 Determinação das temperaturas de anelamento para culturas puras

Uma forma de garantir a aplicação dos *primers* para estudo dos patógenos propostos no presente trabalho é testar sua especificidade usando controles positivos e negativos. Apesar dos ciclos de temperatura, e principalmente da temperatura de anelamento, serem apresentados pelos autores que desenvolveram os *primers*, é possível que sob os diferentes reagentes, a temperatura de anelamento ideal seja diferente da publicada pelos autores. Por isso, há necessidade da realização de testes para otimizar a detecção das bactérias.

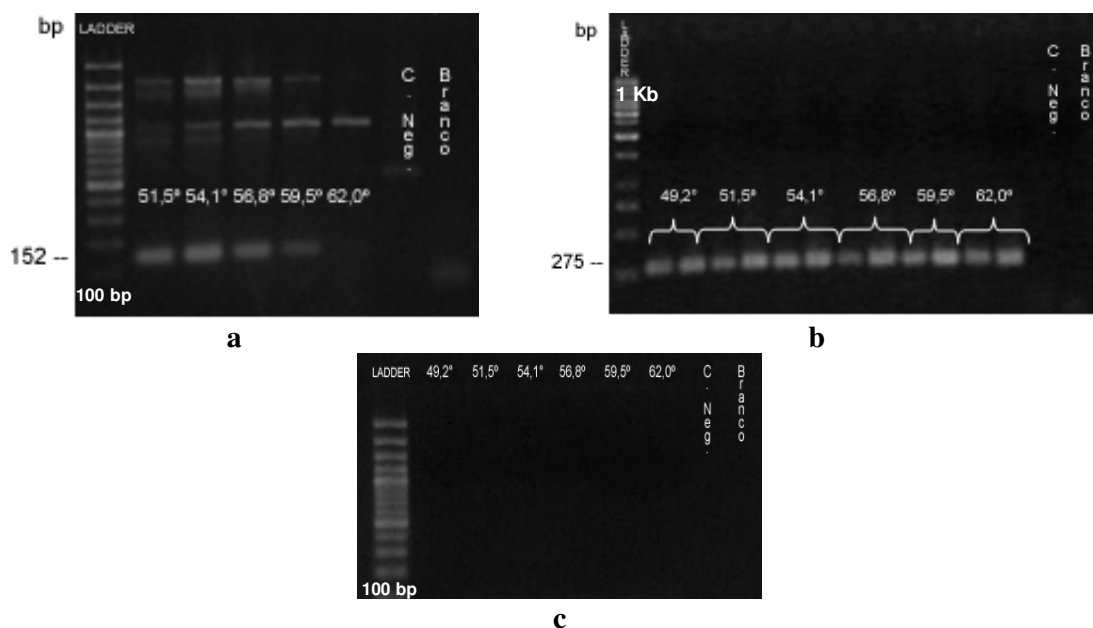
As Figuras 5.8 e 5.9 mostram os resultados do PCR-gradiente para as culturas puras de bactérias. O PCR-gradiente foi feito com a temperatura de anelamento do *primer* variando, na maioria dos casos, entre 49,2°C e 62,0°C. A quantidade de amostra de DNA nas reações de PCR para as culturas puras foi sempre 0,5 µL do extrato de DNA, exceto nas reações que utilizaram os *primers* para *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., onde utilizou-se extrato de DNA diluído dez vezes, já que os resultados sem diluição para *E. coli* não estavam amplificando. Para *Salmonella* spp., optou-se por utilizar extrato de DNA diluído 10X simplesmente para teste. Não se realizou PCR-gradiente para *Escherichia coli* enterohemorrágica, devido à ausência de uma cultura pura.



**Figura 5.8** - Resultados do PCR-gradiente para as culturas puras testadas: a) *Escherichia coli*, *primers* L-uid739 e R-uid578; b) *Enterococcus faecalis*, *primers* Ent1 e Ent2; c) *Helicobacter pylori*, *primers* HP1 e HP2 d) *Salmonella* spp., *primers* L-himA e R-himA; e) *Shigella sonnei*, *primers* Shi-1 e Shi-2; f) *Staphylococcus aureus*, *primers* nuc1 e nuc2. Controles negativos: *Salmonella* (a, b), *E. coli* (c, d, f), *Yersinia enterocolitica* (e).

De acordo com a Figura 5.8a, que mostra o PCR-gradiente para as culturas puras de *E. coli*, pode-se notar que as temperaturas de anelamento 49,2°C e 54,1°C geraram bandas de PCR fracas, ou seja, foram temperaturas que não permitiram que o DNA alcançasse uma boa

amplificação, diferentemente das demais temperaturas. Com relação ao PCR-gradiente das culturas puras de *Enterococcus faecalis* e *Helicobacter pylori*, todas as temperaturas de anelamento dos *primers* se mostraram satisfatórias. Na Figura 5.9b, cada par de bandas corresponde a uma temperatura. A primeira banda equivale à amostra de DNA sem diluição e a segunda, à amostra de DNA com diluição de 10X. Como este PCR-gradiente foi o primeiro a ser realizado, preferiu-se testar também diluições de 1:10. No entanto, como houve uma boa amplificação em todas as bandas, optou-se por fazer as próximas reações de PCR-gradiente, inicialmente, com extratos de DNA não diluído. Somente se não houvesse amplificação, o próximo passo seria diluição de 10X, como se procedeu para *E. coli*.



**Figura 5.9** - Resultados do PCR-gradiente para as culturas puras testadas: a) *Shigella sonnei*, *primers* L-phoBR e R-phoBR; b) *Salmonella* spp., *primers* Sal-3 e Sal-4; c) *Yersinia enterocolitica*, *primers* Y.16S-86f e Y.e.eur.16S-455r. Controles negativos: *Yersinia enterocolitica* (a), *Enterococcus faecalis* (b), *Shigella sonnei* (c).

Como o resultado da PCR foi positivo para as culturas puras, significa que os *primers* se anelaram perfeitamente ao DNA bacteriano, confirmando sua especificidade. Ao observar com detalhe as Figuras 5.8 e 5.9, nota-se que as bandas que apresentaram uma maior intensidade estão por volta da temperatura de anelamento de 55°C. Com isso, foi montado um Programa Geral, conforme descrito no item 4.5 da metodologia, com a temperatura de anelamento de 55°C, o qual foi adotado em todas as reações de PCR que foram feitas nas etapas seguintes da pesquisa.

Para a maioria das culturas, houve amplificação em todas as temperaturas testadas, exceto para *Shigella sonnei*, onde não houve amplificação na maior temperatura de anelamento, na qual era esperada a formação de um fragmento do tamanho de 152 pb (Figura 5.9a). Porém, para esta mesma cultura, foi verificada a formação de bandas inespecíficas, cujo tamanho dos fragmentos inespecíficos eram de 900, 1100, 2000 e 2250 pb,, mesmo após inúmeras tentativas para aumentar a especificidade da reação.

O PCR para a cultura pura de *Yersinia enterocolitica* foi negativo, como mostrado na Figura 5.9c. Ou seja, não foi possível estabelecer as condições de amplificação do DNA extraído da cultura pura de *Yersinia*. Testes foram feitos na tentativa de alcançar a amplificação, como mudanças na concentração do DNA *template*, até mesmo o “Nested PCR”, no qual foi utilizado o par de *primer* geral Epsilon (5'-GAGASTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1541r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (EMBLEY, 1991) para o gene DNAr 16S. O resultado foi positivo para o *primer* geral, mas não gerou produtos após aplicação dos *primers* específicos (resultados não mostrados). Dessa forma, nenhuma mudança foi satisfatória para se conseguir resultado positivo.

### 5.3.2 Detecção das bactérias patogênicas por PCR

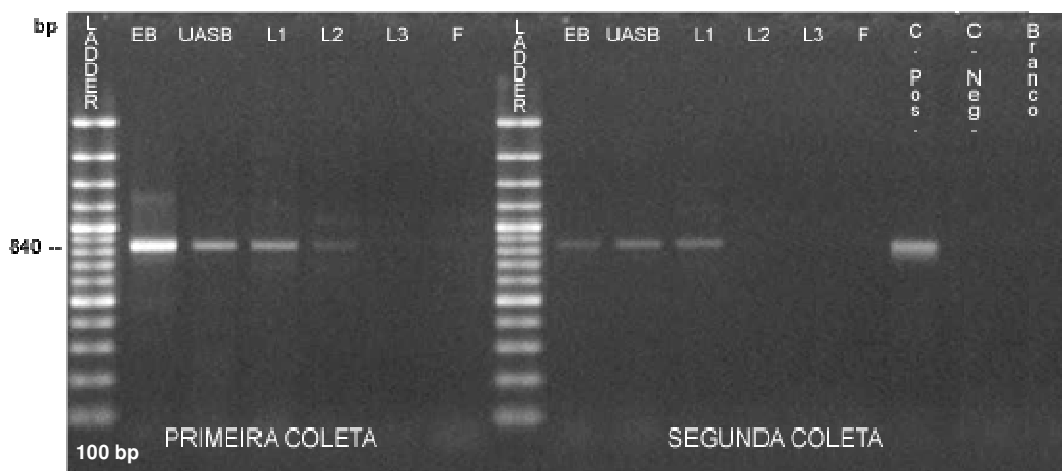
Após a extração do DNA das amostras, uma quantidade deste DNA foi utilizada nas reações de PCR para a análise da presença e da ausência das bactérias potencialmente patogênicas nas amostras de esgoto bruto e tratado oriundas da primeira e segunda campanha.

Uma concentração não ideal de DNA pode gerar dois cenários de resultados. Considerando que o DNA da bactéria alvo encontra-se em baixa concentração, recomenda-se a utilização do dobro do volume da amostra a fim de garantir que tenha DNA suficiente para gerar amplicons suficientes. Porém a elevada concentração de DNA *template* pode gerar problemas no PCR, tais como bandas inespecíficas (WALKER *et al.*, 1999) e inibição pela presença de contaminantes, gerando resultados falso-negativos. Por isso, testes empíricos foram feitos utilizando-se 0,5 a 2 µL de amostra do DNA extraído (diluído ou não) para garantir a segurança do resultado obtido. Os resultados destes diferentes testes (resultados não mostrados) indicaram a impossibilidade de adotar a mesma diluição para as diferentes amostras, e ainda a impossibilidade de adotar as diluições específicas para cada par de *primers* testados.

### 5.3.2.1 *Escherichia coli* e *Escherichia coli* enterohemorrágica

O monitoramento de *Escherichia coli* ao longo do sistema UASB-LP foi feito pela utilização de *primers* para o gene *uidA*, cuja função é codificar a enzima betaglucuronidase. Esta mesma enzima, no método do Colilert, reage com o substrato fluorogênico para indicar a presença da bactéria fecal *Escherichia coli*. O gene *uid* tem sido usado para detectar *E. coli* em amostras aquáticas (BEJ *et al.*, 1991; 2004).

O resultado do monitoramento no sistema UASB-LP está mostrado na Figura 5.10. A eletroforese em gel de agarose mostrou que *E. coli* foi detectada no esgoto bruto, no efluente do UASB, da lagoa 1 tanto na primeira quanto na segunda coleta. Na primeira coleta, foi verificado uma banda fraca também no efluente da lagoa 2. Como a intensidade das bandas em um mesmo gel é proporcional a quantidade de DNA marcado pelo brometo de etídio, o gradiente de intensidade mostrado na Figura 5.10 poderia indicar decaimento de DNA de *E. coli* desde o esgoto bruto até o efluente da lagoa 2, sendo que nos efluentes da lagoa 3 e do filtro, a quantidade de DNA de *E. coli* estaria abaixo do limite de detecção do método. Como o volume de DNA *template* usado nas reações de PCR foi o mesmo e assumindo que as extrações de DNA tenham gerado DNA com concentrações semelhantes, pode-se considerar a intensidade do sinal como estimativa indireta da quantidade de DNA amplificado.



**Figura 5.10** – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os *primers* para *Escherichia coli*.

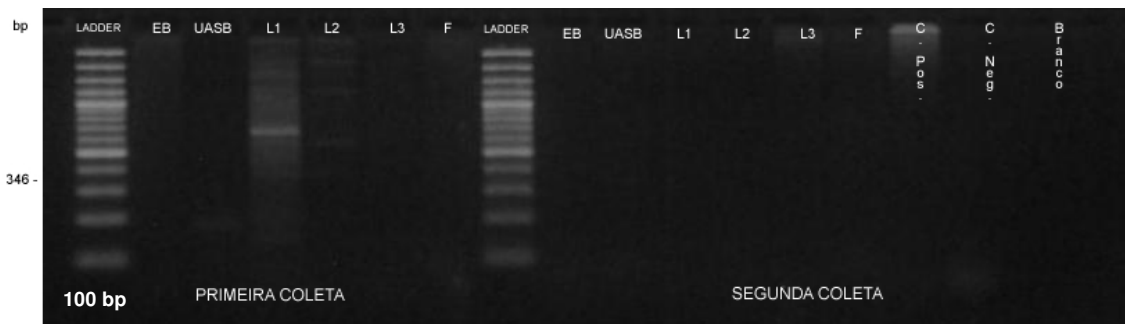
Os resultados obtidos para o monitoramento de *E. coli* ao longo do sistema UASB-LP mostram que o sistema de lagoas em série é o maior responsável pelo decaimento de *E. coli*. Este resultado está de acordo com os resultados de monitoramento de coliformes nos efluentes

do sistema (na ordem de  $10^7$  NMP/100 mL para esgoto bruto e efluente do UASB,  $10^5$  NMP/100 mL para efluente da lagoa 1,  $10^4$  NMP/100 mL para efluente da lagoa 2 e  $10^3$  NMP/100 mL para efluente da lagoa 3) (ANDRADA, 2005). Segundo as análises de coliformes, o filtro apresenta pouco decaimento, sendo a mesma ordem de grandeza da concentração para o efluente da lagoa 3 (ANDRADA, 2005).

Conforme mencionado, a não amplificação de DNA de *E. coli* nos efluentes da lagoa 3 e filtro sugere que estas bactérias encontram-se nestas amostras em quantidades muito reduzidas, chegando a  $10^3$  NMP/100mL, como mostrado por Andrada (2005). Porém, ressalta-se a necessidade de investigar diretamente as espécies patogênicas de *E. coli*, pois como discutido no item 3.3, a dose infectante de *E. coli* enterohemorrágica é extremamente baixa, na ordem de  $10$  a  $10^2$  células.

Investigações desenvolvidas por Lee *et al.* (2006) utilizando a técnica de PCR em tempo real mostraram que dentre os valores de *E. coli* total detectados em esgotos brutos (na ordem de  $10^7$  NMP/100mL),  $10^4$  NMP/100mL estava relacionada a cepas patogênicas. Há pouca informação sobre cepas patogênicas de *E. coli* em esgotos e lodos, porém é razoável assumir que a presença destas cepas em esgotos domésticos ocorrerá, pelo menos esporadicamente, refletindo a incidência de infecções na comunidade. Já em amostras do esgoto tratado (lodo ativado seguindo por desinfecção em UV), esta bactéria não foi detectada (LEE *et al.*, 2006).

No presente estudo foi utilizado apenas um par de *primers*, L-vt2a e L-vt2b, para investigação da cepa patogênica de *E. coli* enterohemorrágica (Figura 5.11). Infelizmente não foi possível padronizar as condições de PCR para esta bactéria pela ausência de uma cultura pura para a realização dos testes. Mesmo assim, as reações com as amostras na presença destes *primers* foram realizadas utilizando o programa descrito por Bej *et al.* (2004) e o programa geral (Figura 5.11). Os resultados foram negativos, mesmo após a adoção da estratégia de minimização dos possíveis efeitos inibitórios da PCR (concentração de DNA *template*, remoção do reagente BSA, aumento na temperatura de anelamento dos *primers* de  $55^\circ\text{C}$  para  $58^\circ\text{C}$ ). Apesar deste resultado indicar que a quantidade de DNA da cepa enterohemorrágica no esgoto bruto e nos efluentes das unidades de tratamento era muito baixa, é difícil afirmar esta ocorrência pela ausência da padronização das condições do PCR para este organismo. Há uma ressalva a se fazer em relação a uma banda de PCR presente na lagoa 1 da Figura 5.11. Esta banda no gel não é a banda referente ao amplicon para *E. coli* enterohemorrágica, cujo tamanho esperado era de 346 pb.



**Figura 5.11** – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os *primers* para *Escherichia coli* enterohemorrágica.

### 5.3.2.2 *Samonella* spp. e *Salmonella typhimurium*

Estudos realizados por Ampofó e Clerk (2003) mostraram que bactérias do gênero *Salmonella* são a terceira mais abundante bactéria patogênica detectada no esgoto tratado pelo sistema composto por 4 lagoas de maturação em série (cerca de 9% das bactérias patogênicas detectadas). Além deste estudo, outros já apontaram presença deste gênero em esgotos brutos e tratados, o que mostra a necessidade de seu monitoramento.

Os resultados do monitoramento de *Salmonella* spp. estão apresentados na Figura 5.12. Apesar das inúmeras tentativas de minimização de bandas inespecíficas, a melhor condição de amplificação ainda gerou uma banda adicional. Apesar deste efeito, a banda referente ao amplicon de 275 pb foi visualizada e portanto, considerada como resultado positivo da amplificação de *Salmonella* spp. De acordo com a Figura 5.12, observa-se resultado positivo apenas para os efluentes das lagoas 1 e 2 e do filtro, e uma fraca banda para o efluente da lagoa 3, resultados estes que indicam presença de espécies deste gênero nas amostras descritas. Porém, este resultado ocorreu apenas para amostras coletadas na primeira campanha (25/04/07), enquanto que para as amostras da segunda campanha (27/02/08), os resultados foram negativos para todas as amostras.

A diferença de resultado entre as duas campanhas de coleta pode estar associada a condições de operação das lagoas ou a condições físico-químicas das lagoas nos momentos da coleta, as quais serão discutidas no item 5.4.



**Figura 5.12** – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os *primers* para *Salmonella* spp.

Informações da literatura apontam que, apesar de apresentar decaimento, bactérias do gênero *Salmonella* na ordem de  $2,8 \times 10^3$  NMP/100mL podem ser detectadas em efluentes de sistemas que adotam lagoas para polimento do tratamento secundário (Pant e Mittal, 2007).

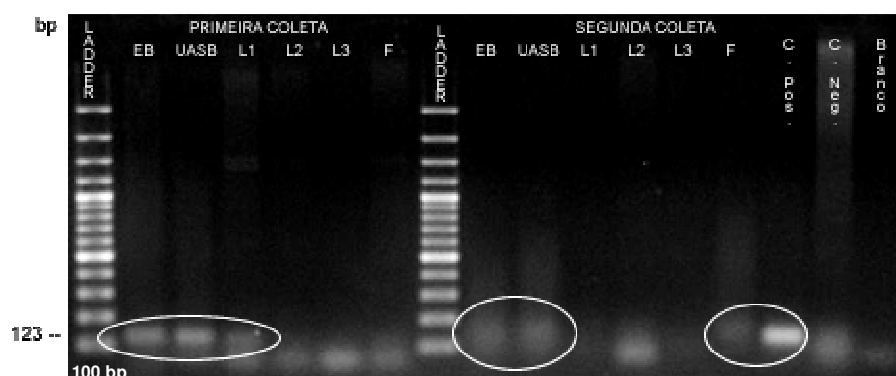
Com o intuito de identificar qual espécie do gênero *Salmonella* seria o responsável pelo resultado positivo do monitoramento, foi utilizado um par de *primer* específico para *Salmonella typhimurium*. Os resultados, apresentados na Figura 5.13, mostram reações positivas para *S. typhimurium* nas amostras de esgoto bruto, efluente do UASB (nas duas campanhas) e um fraco sinal no efluente da lagoa 1 (campanha 1) e no efluente do filtro (campanha 2). Estes resultados indicam que sistema UASB-LP apresentou decaimento ao longo de suas unidades na quantidade de *Salmonella typhimurium* (exceto na campanha 2). Porém, de uma forma geral estes resultados contrastam com os obtidos para o gênero *Salmonella* apresentados acima. Esperar-se-ia um comportamento similar entre gênero e espécie, porém isto não foi verificado.

É possível que este efeito possa ser devido aos *primers* utilizados. A detecção do gênero ocorreu pela detecção do gene *invA* (WANG *et al.*, 1997), cuja função é codificar proteínas relacionadas com a penetração celular, sendo considerado um componente essencial para a patogênese da doença (SANTOS *et al.*, 2001), enquanto que para a espécie *S. typhimurium*, o gene alvo foi *himA* (BEJ *et al.*, 1994), um gene que codifica uma proteína de transporte na membrana. Em especial, a proteína codificada pelo gene *himA* está presente em várias bactérias entéricas, incluindo *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (BEJ *et al.*, 1994), o que poderia resultar em falsos positivos para *S. typhimurium*, principalmente nas amostras de

EB e efluente do UASB, onde *E. coli* foi fortemente detectada. Porém, segundo os autores dos *primers* para o gene *himA*, eles afirmam que a seqüência de nucleotídeos de *S. typhimurium* e outras bactérias entéricas não é totalmente homóloga, e que desta forma, a depender das condições da amplificação, a reação cruzada não ocorrerá. Desta maneira, considerando que a presente pesquisa utilizou como controle negativo DNA de *E. coli* e que não houve amplificação, o resultado falso positivo no EB e efluente do UASB devido à reação cruzada com *E. coli* está descartada.

Uma outra hipótese remota, mas que talvez pudesse ser usada para explicar a ausência de *Salmonella* spp. no EB e UASB é baseada no estudo de Rahn *et al.* (1992). Os autores, ao realizar ensaios de especificidade e seletividade com iniciadores derivados do gene *invA*, testaram 630 amostras de salmonelas e 142 amostras de microrganismos não-salmonelas, incluindo 21 gêneros e verificaram amplificação em todas as amostras de DNA de *Salmonella*, exceto *Salmonella litchfield* e *Salmonella senftenberg*. Conforme os autores, a aparente ausência do gene *invA* em *S. litchfield* e *S. senftenberg* sugere que estes organismos não são invasivos, ou possuiriam caminhos alternativos de penetração celular, com potencial patogênico ainda desconhecido. Assim, não se pode descartar a idéia de que talvez essas duas espécies de salmonelas que não possuem o gene *invA* estivessem em grande quantidade nas amostras de EB e UASB da primeira coleta, e as demais espécies, em quantidades abaixo do limite de detecção.

O limite de detecção dos *primers* utilizados para investigação de salmonelas é  $10^2$  células/g para a espécie *S. typhimurium* (BEJ *et al.*, 1994). Desta forma, considera-se que nos efluentes das lagoas e do filtro houve presença de *S. typhimurium* pelo menos em quantidade de  $10^2$  células. Trata-se de um importante resultado, pois indica que em lagoas o decaimento de *Salmonella typhimurium* pode não seguir o decaimento de *E. coli* como tem sido relatado. Porém, mais investigações necessitam ser conduzidas a fim de determinar a concentração destes microrganismos no sistema, bem como os fatores ambientais que controlam seu decaimento em lagoas.



**Figura 5.13** – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os *primers* para *Salmonella typhimurium*.

### 5.3.2.3 *Shigella* spp. e *Shigella dysenteriae*

O resultado das ampliações das amostras do sistema UASB-LP com *primers* para o gênero *Shigella* está ilustrado na Figura 5.14..

Resultados positivos de PCR (amplicons com 610 pares de base) foram obtidos para os efluentes do UASB e lagoa 1, coletados na primeira campanha, enquanto que os resultados das demais amostras bem como as amostras da campanha 2 foram negativos. De acordo com Wang *et al.* (1997), a detecção para *Shigella* com este par de *primers* apresenta baixa sensibilidade ( $5 \times 10^4$  células), ou seja, é necessário aproximadamente  $5 \times 10^4$  células de *Shigella* em 1 mL de cultura pura para que o resultado do PCR seja positivo. Desta forma, pode-se supor que nas amostras das lagoas e filtro, bem como para as amostras da segunda coleta, a concentração de *Shigella* era menor que  $10^4$  células. Segundo resultados de Pant e Mittal (2007), o sistema de 4 lagoas de maturação em série promoveu o decaimento de duas unidades logarítmicas de bactérias do gênero *Shigella*, com estimativa de  $3,7 \times 10$  NMP/100mL no esgoto tratado, ou seja, concentração abaixo do limite de detecção dos *primers* utilizados.

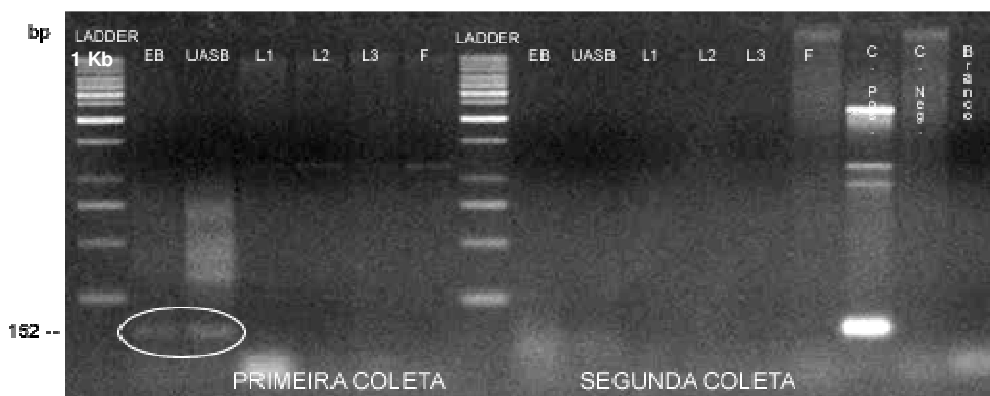
Desta forma, assumindo que a concentração de bactérias do gênero *Shigella* esteja abaixo do limite de detecção, recomenda-se a utilização de *primers* mais sensíveis para monitoramento do gênero *Shigella* em lagoas de polimento.

O monitoramento com o *primer* específico de *Shigella dysenteriae* mostrou resultado um pouco parecido com o obtido para o gênero, sendo que não foi alcançada amplificação para as amostras dos efluentes das lagoas 2, 3 e do filtro e amplificação positiva para o efluente do

UASB (Figura 5.15). Porém, a amostra do efluente bruto apresentou amplificação para a espécie *S. dysenteriae*, apesar do resultado do *primer* para o gênero ter dado negativo. Acredita-se que a não amplificação do esgoto bruto com o *primer* para *Shigella* spp. pode ser devido a efeitos inibitórios da reação, apesar das diversas tentativas de otimização da amplificação nesta amostra.



**Figura 5.14** – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os *primers* para *Shigella* spp.



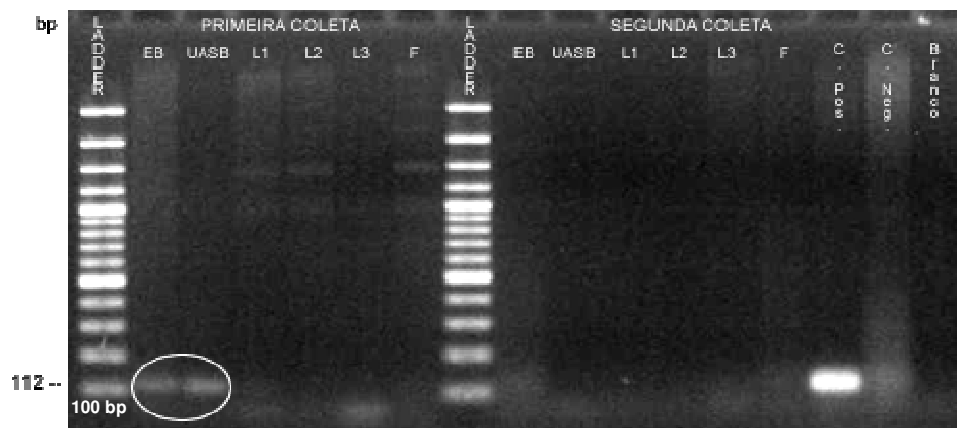
**Figura 5.15** – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os *primers* para *Shigella dysenteriae*.

#### 5.3.2.4 *Enterococcus* spp

O monitoramento de *Enterococcus* envolveu o uso do par de *primers* para o gene *tuf*, responsável pela codificação de uma proteína envolvida na formação de cadeias peptídicas durante a síntese proteica (KE *et al.*, 1999). Trata-se de um gene que pode ser detectado na maioria das espécies de enterococos com alta sensibilidade de detecção e boa especificidade (KE *et al.*, 1999). Os resultados das reações com os *primers* para *Enterococcus* spp. estão apresentados na Figura 5.16, onde se observa a presença de bandas nas amostras de esgoto bruto e efluente do UASB.

Diversos trabalhos já mostraram a presença de espécies de *Enterococcus* em esgotos brutos na ordem de  $10^3$  a  $10^6$  células/100 mL (LEE *et al.*, 2006, PAYMENT *et al.*, 2001, CEBALLOS, 2000, MADERA *et al.*, 2002, ARRIDGE *et al.*, 1995). Já em esgoto tratado, a maioria dos trabalhos com uso de lagoas em série apresenta elevada eficiência de remoção ( $> 99\%$ ) para *E. faecalis*, sendo o número de células na ordem de 300 org/100mL (CEBALLOS, 2000) e  $9,4 \times 10^3$  UFC/100mL (MADERA, 2002). De acordo com os resultados da presente pesquisa, a ausência de ampliações com as amostras dos efluentes das lagoas sugere que o sistema foi efetivo para promover o decaimento de *Enterococcus*.

As espécies de enterococos são capazes de sobreviver longos períodos em ambientes naturais, sob a exposição direta de luz solar (BALE *et al.*, 1993). No entanto, as lagoas de polimento mostraram-se eficientes no decaimento destes. A concentração de oxigênio dissolvido pode também ter contribuído para remoção de enterococcus devido à sensibilidade apresentada por algumas espécies a altos teores de oxigênio dissolvido (CURTIS, 2003).

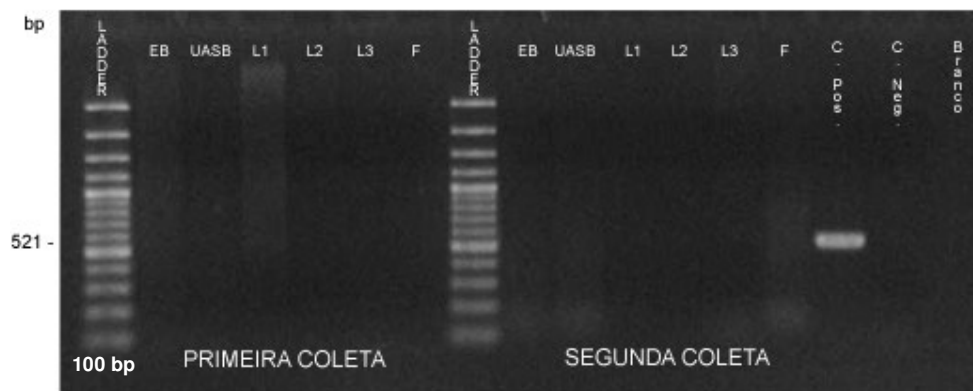


**Figura 5.16** – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os *primers* para *Enterococcus* spp.

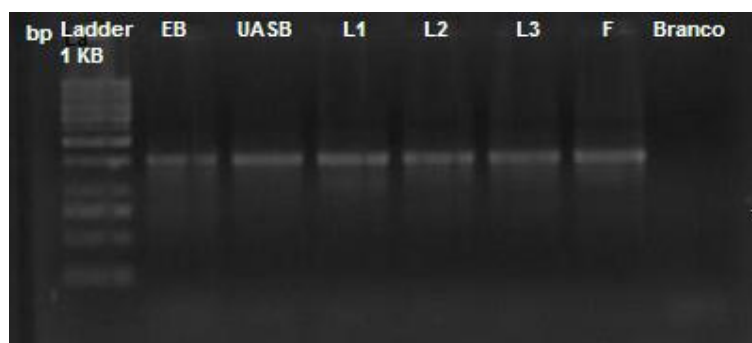
### 5.3.2.5 *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori*, bactéria relacionada ao desenvolvimento de gastrites e úlceras gástricas, é considerada um patógeno emergente e sua distribuição em águas contaminadas tem sido alvo de alguns estudos. Segundo Schroeder e Wuertz (2003), a forma de disseminação desta bactéria ainda é incerta, porém estudos recentes investigam a hipótese de que *H. pylori* seja veiculada também por águas contaminadas. Indicações de Klein *et al.* (1991) apontam para o fato que no Peru, a água é o principal fator de risco para a aquisição de *H. pylori*.

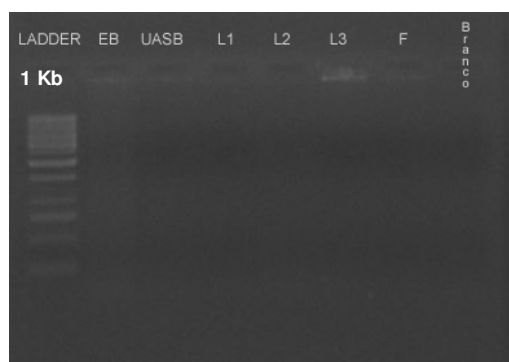
Com o objetivo de verificar se *H. pylori* está presente no esgoto bruto e ao longo do sistema UASB-LP, foi realizado o monitoramento desta espécie usando *primers* para o gene rDNA 16S (LU *et al.*, 2002). Os resultados do monitoramento de *H. pylori* nas amostras do sistema UASB-LP foram negativos (Figura 5.17), mesmo após as mudanças que levariam a uma otimização das reações de PCR das amostras (diminuição da temperatura de anelamento, diluição das amostras, aumento no volume de DNA *template*). Também foi utilizado a estratégia de “Nested PCR”, para as amostras coletadas na primeira campanha, onde foi aplicado o par de *primers* 1541 e Ep.F10 para o gene DNAr 16S para o domínio *Bactéria* (Figura 5.18) e o uso dos amplicons para uma nova reação de PCR com os *primers* de uma região do gene DNAr 16S, específico de *Helicobacter pylori*. Porém, os resultados desta segunda amplificação também foram negativos (Figura 5.19).



**Figura 5.17** – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os *primers* para *Helicobacter pylori*.



**Figura 5.18** – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os *primers* 1541 e Ep.F10 para o domínio *Bactéria*.



**Figura 5.19** – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os *primers* para *Helicobacter pylori*.

Desta forma, pode-se considerar que a quantidade de células de *H. pylori* no sistema UASB-LP é baixa, uma vez que a quantidade de DNA desta espécie está abaixo do limite de detecção do método ( $10^2$  ou  $10^3$  células/mL), de acordo com o limite de detecção geral de PCR (SHARMA e CARLSON, 2000). Outros trabalhos que investigaram a presença desta bactéria em amostras de esgoto bruto e tratado também não a detectaram (LEE *et al.*, 2006).

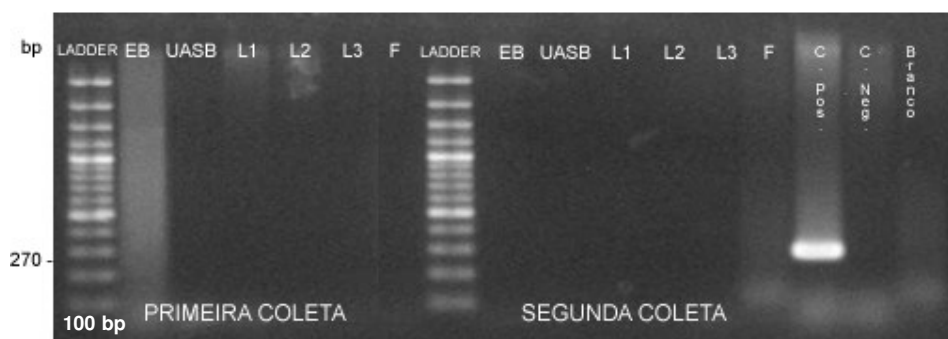
#### 5.3.2.6 *Staphylococcus aureus*

Assim como para *H. pylori*, os resultados foram negativos para todas as tentativas de detecção de *Staphylococcus aureus* em todas as amostras do sistema UASB-LP (Figura 5.19). Porém, este resultado parece coerente quando comparado ao estudo realizado por Lee *et al.* (2006) em sua avaliação do sistema composto por Lodo ativado, seguido de desinfecção por radiação ultravioleta, utilizando a técnica PCR em tempo real para quantificação das bactérias patogênicas.

Considerando o limite de detecção para o par de *primers* utilizados no presente estudo, pode-se considerar que a quantidade de células de *S. aureus* no sistema UASB-LP é baixa, uma vez que a quantidade de DNA desta espécie está abaixo do limite de detecção do método ( $10^6$ /g de amostra de lodo ou 20 células), considerando que o gene *nuc* é um bom marcador para investigação deste organismo (gene que codifica a enzima nuclease extracelular termoestável de *S. aureus*) (BURTSCHER e WUERTZ, 2003, WANG *et al.*, 1997).

Ampofo e Clerk (2003) reportaram que das 12 bactérias patogênicas investigadas no sistema composto por 4 lagoas de maturação em série, *Staphylococcus* foi a menos abundante, contado por menos de 1% das bactérias patogênicas detectadas. Apesar de ser uma bactéria bastante relevante do ponto de vista clínico, já que apresenta resistência a inúmeros

antibióticos além de causar infecções, a presença desta espécie em esgotos brutos e tratados talvez esteja relacionado à incidência de infecções na comunidade.



**Figura 5.20** – PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB, efluentes das lagoas 1, 2, 3 e do efluente ao filtro, utilizando os *primers* para *Staphylococcus aureus*.

#### 5.3.2.7 *Yersinia enterocolítica*

Ampofo e Clerk (2003) reportaram que das bactérias patogênicas investigadas no sistema composto por 4 lagoas de maturação em série, *Yersinia* foi uma das menos abundante, representando menos de 0,5% das bactérias patogênicas detectadas.

Não houve resultado de PCR para a detecção da bactéria patogênica *Yersinia enterocolítica*, já que o PCR gradiente para a investigação da mesma foi negativo para todas as amostras, mesmo após a realização de vários testes com cultura pura sem sucesso. Apesar disso, a ausência de *Yersinia* nas amostras de esgoto bruto e do sistema UASB-LP era, de certa forma esperada, pois há indicações de que este gênero seja preferencialmente encontrado em países de clima temperado e frio (CARNIEL *et al.*, 2006).

Uma comparação entre a sequência do *primer* com sequências de DNA de diferentes espécies de *Yersinia* mostrou 100% de homologia. Considerando que o par de *primers* seja específico de *Yersinia*, há necessidade de confirmar a identidade da cultura pura adquirida, pois a não amplificação sugere que a cultura não seja do gênero *Yersinia*.

### 5.4 **Comparação do monitoramento de bactérias patogênicas entre coletas**

A Tabela 5.1 sumariza os resultados encontrados com o monitoramento dos patógenos nas duas coletas realizadas. Nota-se como problema principal a ausência quase total de bactérias patogênicas na segunda coleta. Os resultados negativos podem ter ocorrido porque a segunda

coleta foi realizada em um dia em que ocorreu alteração da vazão afluyente à ETE Arrudas, devido a problemas operacionais na tubulação e na bomba que encaminha o esgoto bruto para as unidades. A diminuição da vazão afluyente à ETE Arrudas por causa destes problemas operacionais pode ter sido a explicação pela queda do número bactérias patogênicas na segunda coleta.

**Tabela 5.1** - Resultados de PCR para as bactérias investigadas

Bactérias	Primeira Coleta						Segunda Coleta					
	EB	UASB	L1	L2	L3	F	EB	UASB	L1	L2	L3	F
<i>E. coli</i> Total	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Shigella</i> spp.	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Helicobacter pylori</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Além disso, os dias anteriores foram muito chuvosos, fazendo com que os efluentes da segunda coleta ficassem mais diluídos em relação aos efluentes da primeira coleta. Os parâmetros físico-químicos, tais como pH, OD, temperatura e turbidez, apresentados nas Tabelas 9.1 e 9.2 do Anexo 1, nos dias das duas coletas, não apresentaram nenhuma anormalidade que pudessem relacionar as variações obtidas nos resultados microbiológicos.

A PCR foi positiva apenas para *E. coli* e *Salmonella typhimurium*, na segunda coleta, mesmo assim, com intensidade de bandas muito baixa. A diminuição da vazão contribuiu para o aumento do tempo de detenção hidráulica do efluente nas unidades do sistema. Consequentemente, quanto mais tempo o efluente permaneceu nas lagoas, mais susceptível ele ficou aos fatores externos que promovem o decaimento de organismos patogênicos, tais como pH, temperatura, compostos tóxicos, escassez de alimento, entre outros.

Não houve nenhum indício de problemas no momento da coleta das amostras da segunda campanha, assim como problemas durante a extração do DNA das mesmas. A coleta transcorreu normalmente e a extração foi de boa qualidade, como pode ser visto na Figura 5.6.

## **5.5 Comparação do monitoramento de bactérias patogênicas entre unidades de tratamento**

Conforme apresentado na Tabela 5.1, os resultados do monitoramento de *E. coli*, *Salmonella typhimurium* (primeira coleta), *Shigella dysenteriae* e *Enterococcus* spp. mostraram que o sistema UASB-LP foi eficaz no decaimento destas bactérias, uma vez que não foi detectado DNA destas bactérias no efluente final. Pode-se considerar que o decaimento ocorreu principalmente no sistema de lagoas em série, conforme previsto.

Sabe-se que reatores UASB não são sistemas designados para remoção de bactérias patogênicas, devido principalmente aos baixos TDH (no caso do presente sistema, TDH de 11,8 horas). Os gêneros *Escherichia*, *Salmonella* e *Shigella* apresentam metabolismo anaeróbio facultativo, sendo capazes de fermentar uma variedade de compostos orgânicos sob condições anaeróbias (MADIGAN *et al.*, 2004). Desta forma, estas bactérias teriam condições de se multiplicarem dentro do reator UASB e contribuiriam através de seu metabolismo para a degradação da matéria orgânica presente no esgoto. A pequena remoção vista nos monitoramentos se refere provavelmente à retenção destas bactérias nos biossólidos do reator UASB, os quais permanecem em sua maioria dentro do reator. Porém este mecanismo de retenção de biomassa não é plenamente eficiente, e geralmente uma pequena parcela de biossólidos são eliminados juntamente com o efluente tratado, o que justifica a detecção destas bactérias no efluente analisado.

Quanto ao processo de remoção de coliformes em lagoas de polimento, este ocorre muito mais pelo efeito sinérgico da luz (provoca aquecimento da água), pH (elevado) e clorofila a (atividade fotossintetizante) do que pelos processos de morte celular, por falta de alimento e predação (TROUSSELLIER *et al.*, 1986). Este efeito sinérgico está relacionado principalmente ao processo de fotossíntese realizado pelas algas, que ocorre na presença de luz e gera elevação no pH do meio. Ao consumir CO<sub>2</sub>, as algas provocam um acúmulo do íon hidroxila elevando o pH do meio (PEARSON, 2003).

Assim como *E. coli*, salmonelas são também sensíveis a altos valores de pH, alta concentração de O.D. e elevação da temperatura, por isso seu decaimento é monitorado indiretamente pelo decaimento de coliformes (CURTIS, 2003). Apesar disso, *Salmonella* spp. foi detectada exclusivamente nos efluentes das lagoas e do filtro, indicando que esta espécie possa ser resistente aos fatores de decaimento em lagoas comparadas ao esgoto bruto e

efluente do UASB. No entanto, não há informações na literatura acerca de uma possível resistência em salmonelas a ambientes de pH elevado, como é o caso das lagoas.

Ao contrário de salmonelas e shigelas, *Helicobacter* e *Enterococcus* não apresentam similaridades fisiológicas e filogenéticas com *E. coli*, e, portanto podem não apresentar as mesmas características de decaimento da *E. coli*. Assim, a avaliação destes grupos deve ser realizada por métodos específicos de detecção. O monitoramento de *Enterococcus* por PCR indicou que este gênero encontra-se ausente ou em concentrações abaixo do limite de detecção do método no esgoto bruto, e coerentemente também não foi detectado nas amostras das unidades de tratamento.

*Helicobacter pylori* é tolerante a altos valores de pH e por ser uma bactéria microaerofílica, é sensível a elevados teores de oxigênio dissolvido (CURTIS, 2003). Apesar de não ter sido detectado *Helicobacter* no esgoto bruto, acredita-se que o sistema de lagoas em série levaria a um decaimento destes organismos devido ao elevado teor de oxigênio nos sistemas.

Os fatores que controlam o decaimento de patógenos nas lagoas não se aplicam no filtro devido a sua diferente configuração. A principal função do filtro ao final da lagoa é remover algas, as quais permanecem aderidas ao meio filtrante constituindo um biofilme e servindo como alimento para outras bactérias que se fixam ao biofilme. O tempo de detenção hidráulico no filtro é bem menor que o da lagoa 3 (6,7 h e 1,3 d respectivamente), porém o sistema de retenção de biomassa permite que células agregadas ao biofilme permaneçam mais tempo no sistema. Tanto *Salmonella* spp. quanto *Salmonella typhimurium* foram detectadas no efluente do filtro. É possível que as poucas células de salmonelas provenientes das unidades anteriores encontrem neste ambiente condições ideais para sua multiplicação celular. Porém mais estudos necessitam ser conduzidos a fim de elucidar a presença exclusiva de *Salmonella* no efluente do filtro.

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que:

- O procedimento 2, descrito no item 4.3, de preparação das amostras que envolveu pré-filtração de 2 L de amostra da lagoa em filtro de 8,0 µm, seguido de filtração da amostra obtida em membrana éster de celulose de 1,2 µm e centrifugação a 4.000 rpm por 20 minutos, mostrou-se eficiente para concentração de bactérias para todas as amostras e remoção de grande parte das algas das amostras dos efluentes das lagoas de polimento.
- A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é adequada e aplicável para detecção de patógenos no sistema UASB-LP para tratamento de esgoto doméstico, desde que bons métodos de preparação de amostras e extração de DNA sejam empregados, e que as melhores condições de amplificação pela PCR sejam estabelecidas. No presente estudo a técnica foi adequada para monitoramento de *E. coli*, *Enterococcus*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella*, *Shigella* e *Staphylococcus*, enquanto que para as demais bactérias analisadas, novos *primers* necessitam ser testados. Uma lista dos equipamentos e reagentes necessários para a realização desta técnica encontra-se no Anexo 2.
- O método de extração de DNA genômico publicado por Egli *et al.* (2003), descrito no item 4.4, mostrou-se como o mais prático, do ponto de vista laboratorial, para a realização da extração de DNA de bactérias presentes nas diferentes amostras.
- Os *primers* para detecção das bactérias *Escherichia coli* (L-uid739 e R-uid578), *Enterococcus* (Ent1 e Ent2), *Helicobacter pylori* (HP1 e HP2), *Salmonella* spp. (Sal-3 e Sal-4), *Salmonella typhimurium* (L-himA e R-himB), *Shigella* spp. (Shi-1 e Shi-2) e *Staphylococcus aureus* (nuc1 e nuc2) foram adequados para monitoramento destas bactérias ao longo do sistema, enquanto que os *primers* para *E. coli* enterohemorrágica (L-vt2a e L-vt2b) e *Yersinia* (Y.16S-86f e Y.e.eur.16S-455r) ainda necessitam de testes com culturas puras.
- O monitoramento das bactérias ao longo do sistema UASB-LP mostrou que as bactérias *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Enterococcus* spp. e *Salmonella typhimurium* (primeira coleta), detectadas no esgoto bruto, foram removidas ao longo do tratamento, não sendo detectadas no efluente final. Já as bactérias *Shigella* spp. e *Salmonella* spp.

foram detectadas nos efluentes das lagoas e filtro. *Helicobacter pylori* e *Staphylococcus aureus* não foram detectadas no esgoto bruto e tão pouco nos efluentes das unidades de tratamento.

- Não foram encontrados dados físico químicos que pudessem ser correlacionados com as variações encontradas entre as duas coletas.

## 7 RECOMENDAÇÕES

A partir da avaliação dos resultados obtidos no presente trabalho, recomenda-se:

- Investigação de outras espécies de bactérias patogênicas, tais como *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* e da espécie de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), a fim de se certificar sobre a qualidade bacteriológica do efluente do sistema UASB-LP.
- Realização de mais coletas para confirmar as variações observadas nos resultados e obter um monitoramento mais representativo.
- Validação do Procedimento 2 de concentração de amostras (P2), extraindo o DNA das células que porventura ficaram retidas nas membranas de 1,2  $\mu\text{m}$  de porosidade.
- Realização de testes para determinação dos limites de detecção das bactérias investigadas pelos *primers* propostos.
- Aplicação de metodologias baseadas em técnicas moleculares quantitativas, tais como FISH ou PCR em tempo real, para quantificação das espécies investigadas e avaliação do decaimento das mesmas ao longo do sistema UASB-LP.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, E.F., SILVA, S.Q., CHERNICHARO, C.A.L. Diversidade microbiana metanogênica em reatores UASB tratando esgoto sanitário e submetidos a diferentes condições operacionais. In: 24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Belo Horizonte: ABES, 2007.

ALONSO, J.L.; SORIANO, A.; CARBAJO, O.; AMOROS, I.; GARELICK, H. Comparison and recovery of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in water with chromogenic medium incubated at 41 and 44,5°. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 3746-3749, 1999.

AMANN, R.; FUCHS, B. M.; BEHRENS, S. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization. *Current Opinion in Microbiology*, v. 12, p. 231-236, 2001.

AMPOFO, J.A.; CLERK, G.C. Diversity of bacteria in sewage treatment plant used as fish culture pond in southern Ghana. *Aquaculture Research*. 34, p. 667-675, 2003.

ANDRADA, J. G. B. *Utilização de filtros grosseiros em efluentes de lagoas de polimento para remoção de algas*. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 102p. 2005.

ANDRADE NETO, C. O. *Sistemas Simples para Tratamento de Esgotos Sanitários: Experiência Brasileira*. Rio de Janeiro: ABES, 1997. 301p.

APHA; AWWA; WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20<sup>th</sup> Baltimore, Maryland: United Book Press, Inc., 1998.

ARRIDGE, H.; ORAGUI, J.I.; PEARSON, H.W.; MARA, D.D.; SILVA, S. A. *Vibrio Cholerae* 01 and *Salmonellae* removal compared with the die-off of faecal indicator organisms in waste stabilization ponds in Northeast Brazil. *Water Science and Technology*. 31(12) p. 249-256, 1995.

BALE, M. J., P. M. BENNETT, J. E. BERINGER, AND M. HINTON. The survival of bacteria exposed to desiccation on surfaces associated with farm buildings. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 75, p. 519-528, 1993.

BASTOS, R.K.X., BEVILACQUA, P.D.; KELLER, R. *Desinfecção de efluentes sanitários*. In: Organismos patogênicos e efeitos sobre a saúde humana. Ed.: Gonçalves, R.F. ABES/RIMA/Projeto PROSAB, 2003. 438p.

BEJ, A.K. *Detection of microbial nucleic acids by polimerase chain reaction in aquatic samples*. Second Edition . In: Molecular Ecology Manual, 2004. p. 369-432.

BEJ, A.K.; MAHBUBANI, M.H.; BOYCE, M.J.; ATLAS, R.M. Detection of *Salmonella* spp. in Oysters by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, n.1, p. 368-373, 1994.

BEJ, A.K.; MAHBUBANI, M.H.; DICESARE, J.L.; ATLAS, R.M. Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 12, p. 3529-3534, 1991.

BITTON, G. *Wastewater Microbiology*. 3 ed. Gainesville: Wiley-Liss, 2005. 746p.

BROWN, T.A. *Molecular Biology*. 2 ed. Manchester: Academic Press, 1998. 255 p. (Gene Analysis; v. II).

- BURTSCHER, C., WUERTZ, S. Evaluation of the use of PCR and Reverse Transcriptase PCR for detection of pathogenic bacteria in biosolids from anaerobic digestors and aerobic composters. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 8, p. 4618-4627, 2003.
- CARNIEL, E.; AUTENRIETH, I.; CORNELIS, G.; FUKUSHIMA, H.; GUINET, F.; ISBERG, R.; PHAM, J.; PRENTICE, M.; SIMONET, M.; SKURNIK, M.; WAUTERS, G. Y. *enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. In: Martin Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K-H.; Stackebrandt, E. (Ed.) *The Prokaryotes*. 3. ed. Springer, 2006. v. 6, p. 270-398.
- CATUNDA, P.F.C., van HAANDEL, A.C. Improved performance and applicability of waste stabilization ponds by pretreatment in a UASB reator. *Water Science and technology*. v.33, n. 7, p.147-156, 1996.
- CAVALCANTI, P.F.F, VAN HANDEL, A.C., KATO, M.T., VON SPERLING. M., LUDUVICE, M.L., MONTEGGIA, L.O. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por lagoas de polimento. In: CHERNICHARO, C.A.L. (coordenador). *Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios*. Rio de Janeiro: ABES, 2001. cap. 3, p. 105-170.
- CEBALLOS, B.S.O. *Eliminación de microorganismos por médio del tratamiento de las águas residuales*. In: MENDONÇA, S.R. Sistemas de lagunas de estabilización. Colômbia. McGrawHill. 370 p, 2000.
- CHAROENCA, N.; FUJIOKA, R.S. Assessment of Staphylococcus bacteria in Hawaii recreational waters. *Water Sci. Technol.*, v. 27, p. 283–289, 1993.
- CHERNICHARO, C. A. L. *Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias. Vol. 5. Reatores Anaeróbios*. Belo Horizonte: DESA – UFMG, 1997. 245 p.
- CHERNICHARO, C. A. L., VAN HANDEL, A.C., FORESTI, E., CYBIS, L.F. Introdução. In: CHERNICHARO, C. A. L. (coordenador). *Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios*. Rio de Janeiro: ABES, 2001. cap. 1, p. 1-12.
- CHERNICHARO, C.A.L.; ZERBINI, A. M.; BITTENCOURT, R. B. Análise comparativa das técnicas de tubos múltiplos e substrato definido, aplicadas à identificação de coliformes em amostras de esgotos brutos e efluentes anaeróbios. In: Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios: coletânea de trabalhos técnicos. Coord. CHERNICHARO, C.A.L. Belo Horizonte, p. 61-69. 2001.
- CURTIS, T. Bacterial pathogen removal in wastewater treatment plants. In: The handbook of water and wastewater Microbiology. Ed.(s): D. Mara and N. Horan. Academic Press, 2003. p. 477-490.
- CURTIS, T.P. The fate of *Vibrio cholera* in wastewater treatment plants. In: DRASAR, B.; FORREST, B. B. (ed). *Ecology and the ecology of Vibrio cholerae*. Chapman and Hall, London. 1996.
- DEVRIESE, L.; BAELE, M.; BUTAYE, P. The Genus Enterococcus: Taxonomy. In: Martin Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K-H.; Stackebrandt, E. (Ed.) *The Prokaryotes*. 3. ed. Springer, 2006. v. 4, p. 163-174.
- DIEP, B.A.; CHAMBERS, H.F.; GRABER, C.J.; SZUMONSKI, J.D.; MILLER, L.D.; HAN, L.L.; CHEN, J.H.; LIN, F.; LIN, J.; PHAN, T.H.; CARLETON, H.A.; MCDOUGAL, L.K.; TENOVER, F.C.; COHEN, D.E.; MAYER, K.H.; SENSABAUGH, G.H.; PERDREAU-REMINGTON, F. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Clone USA300 in Men Have Sex with Men. *Ann Intern Med.*, v. 148, p. 249-257, 2008.

- DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K-H.; STACKEBRANDT, E. *The prokaryotes*. 3 ed. Springer, 2006. 1111p. (The handbook on the biology of bacteria; v. 4).
- EGLI, K.; LANGER, C.; SIEGRIST, H-R.; ZEHNDER, A.J.B.; WAGNER, M.; VAN DER MEER, J.R. Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers during start-up of nitrification reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 6, p. 3213-3222, 2003.
- EMBLEY, T.M. The linear PCR reaction: a simple and robust method for sequencing amplified rRNA genes. *Letters in Applied Microbiology*, v.13, p. 171-174, 1991
- FALCO, P.B. de. Estrutura da comunidade microbiana (algas e bactérias) em um sistema de lagoas de estabilização em duas escalas temporais: Nictemeral e Sazonal. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, USP, São Carlos, 2005.
- FORESTI, E.; ZAIAT, M. VALLERO, M. Anaerobic processes as the core technology for sustainable domestic wastewater treatment: consolidated applications, new trends, perspectives, and challenges. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 5, p. 3-19, 2006.
- GARCIA-ARMISEN, T.; SERVAIS, P. Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, v. 58, p. 269-279, 2004.
- GODINHO, V.M., SILVA, S.Q., NASCIMENTO, F.M.S., von SPERLING, M. Desenvolvimento e aplicação de metodologia para concentração e extração de DNA de bactérias presentes em efluentes de lagoas de polimento. In: 24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Belo Horizonte: ABES, 2007.
- GODINHO, V.M., SILVA, S.Q.; von SPERLING, M.; NASCIMENTO, F.M.S. Caracterização de bactérias patogênicas em sistemas de tratamento de esgotos domésticos - Revisão – *Revista da Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental* (Submetido).
- GUZEWICH, J. J.; MORSE, D. L. Sources of selfish in outbreaks of probable viral gastroenteritis: implications for control. *J. Food Prot.*, v. 49, p. 389-394, 1986.
- HARWOOD, V.; *et al.* Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Applied Environmental Microbiology*, v. 71, n. 6, p. 3163-3170, 2005.
- HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R., PICKUP, R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, v.35, p. 1-21, 1998.
- KE, D.; PICARD, F.J.; MARTINEAU, F.; MENARD, C.; ROY, P.H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, G. Development of a PCR Assay for Rapid Detection of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n.11, p. 3497-3503, 1999.
- KLEIN, P.D., GRAHAM, D.Y., GAILLOUR. A water source as risk factor for Helicobacter pylori infection in peruvian children. *Lancet*, v. 337, p. 1503-1506, 1991.
- KOIVUNEM, J.; SIITONEN, A.; HEINONEN-TANSKI, H. Elimination of enteric bacteria in biological-chemical wastewater treatment and tertiary filtration units. *Water Research*, v. 37, p.690-698, 2003.

- LANGELAND, G. Salmonella spp. In the working environment of sewage treatment plants in Oslo, Norway. *Applied Environmental Microbiology*, v.43, n. 5, p.1111-1115, 1982.
- LECLERC, H.; MOSSEL, D. A. A.; EDBERG, S. C.; STRUIJK, C. B. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annual. Rev. microbiol.*, v. 55, p. 201-234, 2001.
- LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L.; DEI-CAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. In: *Microbial Waterborne Pathogens*. Ed.: CLOETE, T. E. et al. IWA Publishing, London, UK, p. 1-54, 2004.
- LEE, D-Y.; SHANNON, K.; BEAUDETTE, L.A. Detection of bacterial pathogens in municipal wastewater using an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods*, v.65, p. 453-467, 2006.
- LEHOURS, P.; YILMAZ, O. Epidemiology of *H. pylori* infection. *Helicobacter*, v. 12, n.1, p.1-3, 2007.
- LEMARCHAND, K.; BERTHIAUME, F.; MAYNARD, C.; HAREL, J.; PAYMENT, P.; BAYARDELLE, P.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R. Optimization of microbial DNA extraction and purification from raw wastewater samples for downstream pathogen detection by microarrays. *Journal of Microbiological Methods*, v.63, p. 115-126, 2005.
- LU, Y.; REDLINGER, T.E.; AVITIA, R.; GALINDO, A.; GOODMAN, K. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.3, p. 1436-1439, 2002.
- LUDWIG, W., SEEWALDT, E.; KILPPER-BÄLZ, R.; SCHLEIFER, K. H.; MAGRUM, L.; WOESE, C. R.; FOX, G. E.; STACKEBRANDT, E. The phylogenetic position of streptococcus and enterococcus. *J. Gen. Microbiol.* v. 131, p. 543-551, 1985.
- MADERA, C.A.; PEÑA, M.R.; MARA, D.D. Microbiological quality of a waste stabilization pond effluent used for restricted irrigation in Valle Del Cauca, Colombia. *Water Science and Technology*, v.45, n. 1, p. 139-143, 2002.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10ª ed. São Paulo. Pearson Education do Brasil. 608p, 2004.
- MARTINS, T.M.; PESSOA, G.V.A; SANCHEZ, P.S.; SATO, M.I.Z.; COIMBRÃO, C.K.; MARQUES, E. Occurrence of *V. cholerae* 0:1 non-toxigenic in wastewaters from São Paulo, Brazil. *Water Science and Technology*, v. 24, n. 2, p. 363-366, 1991.
- MASCARENHAS, L. C. A. M. *Avaliação do desempenho de lagoas de polimento rasas, em série, para o pós-tratamento de efluente de reator UASB*. 121f. Dissertação de Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- MASCARENHAS, L. C. A.; VON SPERLING, M.; CHERNICHARO, C. A. L. Avaliação do desempenho de lagoas de polimento rasas, em série, para o pós-tratamento de efluentes de reator UASB. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 9, n. 1, p. 45-54, 2004.
- MURRAY, B.E. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 3, p. 46-65, 1990.
- MUYZER, G.; WALL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

- O'FLAHERTY, V.; COLLINS, G.; MAHONY, T. The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatment. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 5, p. 39-55, 2006.
- OLIVEIRA, A.M.R.; *et al.* Prevalence of *H. pylori* in a population from the rural area of Araçuaí, MG, Brazil. *Revista de Microbiologia*, v. 30, p. 59-61. 1999.
- OLIVEIRA, M.; BERNARDO, F. "Fluorescent In Situ Hybridization" aplicado à detecção rápida de *Salmonella* de origem alimentar e ambiental. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 97, n. 542, p. 81-85, 2002.
- ORAGUI, J.I. The removal of excreted bacteria and viruses in deep waste stabilization ponds. *Water Science and Technology*, London, v. 19, p. 569-573, 1987.
- PACE, N. R.; STAHL, D. A.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.*, v. 9, p. 1-55, 1986.
- PANT, A.; MITTAL, A.K. Monitoring of pathogenicity of effluents from the UASB based sewage treatment plant. *Environ. Monit. Assess*, v. 133, p. 43-51, 2007.
- PAYMENT, P.; PLANTE, R.; CEJKA, P. Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts, and *Cryptosporidium* oocysts at a large wastewater primary treatment facility. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 3, p. 188-193:(6), 2001.
- PEARSON, H. *Microbial interactions in facultative and maturation ponds*. In: The handbook of water and wastewater microbiology. Ed.(s): D. Mara and N. Horan. Academic Press, 2003. p. 450-458.
- PENG, X.; LUO, W.; ZHANG, J.; WANG, S.; LIN, S. Rapid detection of *Shigella* species in environmental sewage by an immunocapture PCR universal primers. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 2580-2583, 2002.
- PEREIRA, C.S.; MEDEIROS, L.M.; COSTA, R.G.; FESTIVO, M.L.; REIS, E.M.F.; SEKI, L.M.; RODRIGUES, D.P. Phage typing and multidrug resistance profile in *S. Typhimurium* isolated from different sources in Brazil from 1999 to 2004. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 385-390, 2007.
- PINHEIRO, E. S. Campilobacteriose intestinal. 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: [http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_1/Campilobacteriose/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/Campilobacteriose/index.htm).
- POLLARD, D.; JOHNSON, W.M., LIOR, H., TYLER, S.D., ROOZE, K.R. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v. 28, n. 3, p. 540-545, 1990.
- RAHN, K.; DE GRANDIS, S.A.; CLARKE, R.C.; McEWE, S.A.; GALÁN, J.E.; GINOCCHIO, C.; CURTIS, R.; GYLES, C.L. Amplification of *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*, v. 6, p.271-279, 1992.
- REGNAULT, B.; MARTIN-DELAUTRE, S.; LEJAY-COLLIN, M.; LEFEVRE, M.; GRIMONT, P.A.D. Oligonucleotides probe for the visualization of *Escherichia coli*/*Escherichia fergusonii* cells by in situ hybridization: specificity and potencial applications. *Res. Microbiol.*, v.151, p. 521-533, 2000.

- ROSE, J.B.; DICKSON, L.J.; FARRAH, S.R.; CARNAHAM, R.P. Removal of pathogenic and indicator microorganisms by a full-scale water reclamation facility. *Water Research*, v. 30, p. 2785-2797, 1996.
- SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P.; OLIVEIRA, S.D.; FLORES, M.L.; PONTES, A.P.; PILLOTO, F.; NEVES, N.; SALLE, C.T.P.; LOPES, R.F.F. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). *Arquivos da Faculdade de Veterinária*, v. 29, n. 2, p. 87-92, 2001.
- SCHROEDER, E.; WUERTZ, S. *Bacteria*. In: The handbook of water and wastewater microbiology. Ed.(s): D. Mara and N. Horan. Academic Press, 2003. p. 57-68.
- SHARMA, V.K.; CARLSON, S.A. Simultaneous detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157:H7 with fluorogenic PCR and single enrichment- broth culture. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, p.5472-5476, 2000.
- SHUVAL, H.; FATTAL, B. Control of pathogenic microorganisms in wastewater recycling and reuse in agriculture. In: The handbook of water and wastewater Microbiology. Ed.(s): D. Mara and N. Horan. Academic Press, 2003. p. 241-262.
- SOUZA, E.S.; MARINA, E.M.; TADDEI, C.R.; MUKAI, L.; GILIO, A.E.; RACZ, M.L.; SILVA, L.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. *Jornal de pediatria*, v. 77, n.1, p., 2002.
- STELZER,W.; JACOB, J. A study of *Campylobacter* in sewage, sewage sludge and in river water. *Water Science and Technology*, v. 24, n. 2, p. 117-120, 1991.
- TALLON, P.; MAGAJNA, B.; LOFRANCO, C.; LEUNG, K.T. Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 166, p. 139-166, 2005.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. Artmed Editora S.A., 2005. 894p.
- TROUSSELIER, M., LEGENDRE, P e BALEUX, B. Modelling the evolution of bacterial densities in an eutrophic ecosystem (sewage lagoons). *Microbial Ecology*, v.12, p. 355-379, 1986
- TYLER, K.D.; WANG, G.; TYLER, S.D.; JOHNSON, W.M. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprint of representative bacterial pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 2, p. 199-214, 1997.
- UEHARA, M.Y; VIDAL, W.L. *Operação e manutenção de lagoas anaeróbias e facultativas*. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo. CETESB, (Secretaria do Meio Ambiente-série manuais) 91p. 1989.
- van HAANDEL, A.; LETTINGA, G. *Tratamento anaeróbio de esgotos. Um manual para regiões de clima quente*. Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande. 1994. 245p.
- von SPERLING, M. *Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias. Vol. 1. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. 3ª ed. Belo Horizonte: DESA – UFMG, 2005. 452 p.
- von SPERLING, M. *Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias. Vol. 3. Lagoas de estabilização*. 2ª ed. ampliada e atualizada. Belo Horizonte: DESA – UFMG, 2002. 196 p.
- WALKER, M.; RAPLEY, R. (tradução Fernando Salvador Moreneo). *Guia de rotas na tecnologia do gene*. São Paulo: Editora Ateneu, 1999.

WANG, R.-F.; CAO, W.-W.; CERNIGLIA, C.E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *Journal of Applied Microbiology*, v. 83, p. 727-736, 1997.

WOLF, M.K. Occurrence, distribution and association of O and H serogroups, colonization factors, antigens and toxins of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 10, n. 4, p. 569-584, 1997.

YU, Z.; MOHN W.W. Killing two birds with one stone: simultaneous extraction of DNA and RNA from activated sludge biomass. *Can. J. Microbiol.*, v. 45, p. 269-272, 1999.

## 9 ANEXOS

### 9.1 Anexo 1

**Tabela 9.1 - Parâmetros físico-químicos das amostras do dia 25/04/2007**

Parâmetro	Unidade	EB	UASB	L1	L2	L3	F
pH	-	7,4	7,3	7,7	8,3	9,0	8,1
OD	mg/L	0,3	2,4	17,6	19,0	8,4	0,8
Temperatura	°C	24,2	20,7	25,8	25,3	24,4	24,3
Turbidez	uT	141,0	90,9	39,2	48,2	55,9	49,0
DBO total	mg/L	177	40	22	30	42	39
DBO filtrada	mg/L	50	21	9	9	11	13
DQO total	mg/L	427	146	146	181	185	175
DQO filtrada	mg/L	158	72	98	95	100	80
SST	mg/L	202,0	30,5	75,5	83,5	91,0	60,0
SSV	mg/L	163,0	25,0	63,0	75,0	82,0	53,0
N - total	mg/L	26,9	43,7	29,2	19,7	15,2	13,5
NTK	mg/L	26,9	43,7	29,1	19,6	15,1	13,4
N- Amoniacal	mg/L	24,1	29,7	21,8	11,2	9,5	9,0
N- NO <sub>3</sub>	mg/L	0,043	0,012	0,100	0,056	0,100	0,034
N - NO <sub>2</sub>	mg/L	0,001	0,002	0,002	0,01	0,02	0,01
N- Orgânico	mg/L	2,8	14,0	7,3	8,4	5,6	4,5
Fósforo total	mg/L	1,298	2,043	1,980	2,220	2,069	2,040
P - Fosfato	mg/L	-	-	-	-	-	-

**Tabela 9.2 - Parâmetros físico-químicos das amostras do dia 27/02/2008**

Parâmetro	Unidade	EB	UASB	L1	L2	L3	F
pH	-	7,1	7,0	7,8	7,7	8,0	7,4
OD	mg/L	-	-	-	-	-	-
Temperatura	°C	-	-	-	-	-	-
Turbidez	uT	100	86	18	31	37	32
DBO total	mg/L	219	46	23	34	26	20
DBO filtrada	mg/L	83	21	2	8	5	8
DQO total	mg/L	431	183	161	199	180	112
DQO filtrada	mg/L	488	232	94	102	90	76
SST	mg/L	174	52	16	23	68	11
SSV	mg/L	152	40	8	22	52	2
N - total	mg/L	29,5	30,1	21,0	14,8	13,1	13,7
NTK	mg/L	29,5	30,0	21,0	14,7	13,0	13,6
N- Amoniacal	mg/L	24,4	24,9	17,6	13,6	10,8	11,3
N- NO <sub>3</sub>	mg/L	0,032	0,032	0,053	0,039	0,067	0,049
N - NO <sub>2</sub>	mg/L	0,004	0,005	0,017	0,004	0,008	0,008
N- Orgânico	mg/L	5,1	5,1	3,4	1,1	2,3	2,3
Fósforo total	mg/L	0,459	0,801	0,654	0,527	0,830	1,514
P - Fosfato	mg/L	1,881	1,637	1,846	2,073	1,550	3,397

## 9.2 Anexo 2

**Tabela 9.3** - Equipamentos e reagentes necessários para realização de monitoramentos por PCR (incluindo alguns custos aproximados)

<b>Etapa 1</b> <b>Preparação das amostras</b>	<b>Etapa 2</b> <b>Extração de DNA</b>	<b>Etapa 3</b> <b>PCR</b>
<b>Equipamentos</b>		
Aparato de filtração à vácuo	Microdesmembrador (Mini-Beadbeater – Glen Mills Inc) U\$ 690,00	Termociclador com opção de gradiente de temperatura ( <i>Eppendorf</i> ) U\$ 8.000,00
Centrífuga para velocidades de 4.000 rpm	Microcentrífuga para velocidades até 14.000 rpm ( <i>Minispin, Eppendorf</i> ) U\$ 930,00	Microcentrífuga para velocidades até 14.000 rpm ( <i>Minispin, Eppendorf</i> ) U\$ 930,00
Freezer para armazenamento das amostras	Vortex	Aparato para eletroforese – cuba e fonte
	Micropipetas (10, 200, 1000 µl) ( <i>Eppendorf</i> ) U\$ 180,00 cada	Transiluminador de luz UV (modelo TFM-20) U\$ 1.400,00
	Transiluminador de luz UV (modelo TFM-20) U\$ 1.400,00	Sistema de captura de imagem (modelo Digidoc-It) U\$ 2.800,00
	Sistema de captura de imagem (modelo Digidoc-It) U\$ 2.800,00	Vortex
		Micropipetas (10, 200, 1000 µl) ( <i>Eppendorf</i> ) U\$ 180,00 cada
<b>Reagentes</b>		
	Tampão (50mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA, 3% de SDS)	Enzima Taq + tampão R\$ 200,00 500 unidades
		dNTP R\$ 280,00 1 mL de 10mM
		Oligonucleotídeos ( <i>primers</i> ) R\$ 120,00 - 0,025 umol cada
	Fenol pH equilibrado R\$ 200,00 100g	BSA R\$ 300,00 5g
		Ladder R\$ 350,00 250 ng
		Agarose R\$ 350,00 100g
		Tampão de corrida R\$ 200,00
		Tampão de eletroforese (TAE 1X e 50X))
		Brometo de etídio R\$ 100,00 (10 mL)
<b>Vidros, plásticos, filtros e membranas</b>		
Tubos de centrifugação	Ponteiras (10, 200, 1000 µl) (cada R\$ 50,00 1000 unidades)	Ponteiras (10, 200, 1000 µl) (cada R\$ 50,00 1000 unidades)
Filtro de 8,0 µm de porosidade	Microtubos de 2 mL e 0,5 mL (cada R\$ 50,00 1000 unidades)	Microtubos de 0,1 mL (R\$ 70,00 1000 unidades)
Membrana éster de celulose (1,2 µm de porosidade)		